

Transición epitelio- mesenquimal como diana terapéutica en modelos experimentales de diálisis peritoneal

Jesús Loureiro Álvarez

1. Abreviaturas.....	1-2
2. Resumen.....	3
3. Introducción.....	4-30
3.1. Diálisis peritoneal.....	5-9
3.2. Estructura del peritoneo.....	9-12
3.3. Patogénesis asociada a la diálisis peritoneal.....	12-14
3.4. Células mesoteliales: víctimas, espectadoras o culpables.....	14-18
3.5. Evidencias de TEM en diálisis peritoneal.....	18-21
3.6. Papel patológico de la TEM en el fallo de membrana peritoneal.....	21-23
3.7. Modelos de TEM.....	23-25
3.8. Intervención terapéutica de la TEM.....	25-30
4. Objetivos.....	31-33
5. Material y métodos.....	34-45
5.1. Células.....	35-37
5.1.1. Cierre de heridas.....	36
5.1.2. Ciclo celular y apoptosis.....	36
5.2. Western blot.....	37
5.3. Citometría de flujo.....	38
5.4. RT-PCR cuantitativa.....	38-39
5.4.1. Muestras celulares.....	38
5.4.2. Tejidos de ratón.....	39
5.5. Modelos murinos de diálisis peritoneal.....	39-40

5.5.1. Ratas.....	39
5.5.2. Ratones.....	39-40
5.5.3. Cirugía y tratamiento.....	40-41
5.6. Análisis histológico.....	42-43
5.7. ELISA.....	44
5.8. Péptidos anti-TGF- β 1.....	44-45
5.9. Sobre-expresión de TGF- β 1 en el peritoneo mediado por adenovirus.....	45
5.10. Análisis estadístico.....	45
6. Resultados.....	46-112
6.1. BMP-7.....	47-55
6.1.1. BMP-7 esta constitutivamente expresado en las células mesoteliales y se reprime durante la TEM.....	47-50
6.1.2. BMP-7 contrarresta la TEM inducida por TGF- β 1.....	50-52
6.1.3. BMP-7 disminuye la alteración estructural del peritoneo en un modelo de rata de exposición peritoneal.....	53-57
6.2. Inhibición de Cox-2.....	57-72
6.2.1. La sobreexpresión de COX-2 de las células mesoteliales de pacientes en diálisis peritoneal, está asociada a TEM.....	57-60
6.2.2. COX-2 sufre un aumento de expresión durante la TEM de las células mesoteliales en condiciones <i>in vitro</i>	61-64

6.2.3. Correlación <i>ex vivo</i> entre la expresión de Cox-2 y el transporte peritoneal.....	65-66
6.2.4. El bloqueo <i>in vitro</i> de Cox-2 no tiene efecto sobre la TEM de las células mesoteliales.....	66-67
6.2.5. La inhibición de Cox-2 disminuye la inflamación y el daño peritoneal inducido por líquido de diálisis en ratones.....	67-70
6.2.6. La exposición a soluciones de diálisis bajas en PDGs provoca una menor inflamación y alteración estructural del peritoneo.....	71-72
6.3. Rosiglitazona.....	73-89
6.3.1. El tratamiento con rosiglitazona disminuye las alteraciones estructurales y funcionales inducidas por la exposición al líquido de diálisis en ratones.....	73-78
6.3.2. Efectos del tratamiento con rosiglitazona en la acumulación de AGEs y en la inflamación inducida por la exposición a líquidos de diálisis en ratones.....	79-83
6.3.3. Efectos <i>in vitro</i> de la rosiglitazona sobre la TEM y la muerte celular.....	83-89
6.4. Péptidos anti-TGF β 1 (P17 y P144).....	90-112
6.4.1. El péptido bloqueante de TGF- β 1 P17, contrarresta la TEM inducida por TGF- β 1 y por efluente de peritonitis, en condiciones <i>in vitro</i>	90-91

6.4.2. Los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 disminuyen las alteraciones estructurales y funcionales, producidas en el peritoneo por la exposición a líquido de diálisis.....	91-96
6.4.3. Los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 reducen la acumulación de los fibroblastos FSP-1 ⁺ en respuesta a la diálisis peritoneal.....	97-98
6.4.4. Los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 ejercen un mayor efecto sobre la transición epitelio-mesenquimal inducida por diálisis peritoneal.....	99-104
6.4.5. Las células con un fenotipo intermedio (citoqueratina ⁺ /FSP-1 ⁺) poseen características de miofibroblastos y capacidad fibrogénica.....	104-108
6.4.6. La sobre-expresión de TGF- β 1 induce la acumulación en el peritoneo de fibroblastos FSP- 1 ⁺ , la mayoría de los cuales co-expresa citoqueratina.....	109-111
7. Discusión.....	112-128
7.1. BMP-7.....	113-116
7.2. Inhibición de Cox-2.....	116-119
7.3. Rosiglitazona.....	119-125
7.4. Péptidos bloqueantes de TGF- β 1 (P17 y P144).....	125-128
8. Conclusiones	129-130
9. Bibliografía.....	131-145

10. **Anexo**.....146

Abreviatura	Significado
µg	Microgramo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	Acrónimo del inglés advanced glycation end products
ANOVA	Acrónimo del inglés analysis of variance
BMP-7	Acrónimo del inglés bone morphogenetic protein 7
COX	Acrónimo del inglés Ciclooxygenase
COX-1	Acrónimo del inglés Ciclooxygenase-1
COX-2	Acrónimo del inglés Cyclooxygenase 2
Cr-MTC	Acrónimo del inglés creatinine-mass transfer coefficient
DAPI	Acrónimo del inglés 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acrónimo del inglés Deoxyribonucleic acid
ELISA	acrónimo del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMT	Acrónimo del inglés epitelial-to-mesenchymal transition
FGF-2	Acrónimo del inglés Fibroblast growth factor 2
FoxP3	Acrónimo del inglés forkhead box P3
FSP-1	Acrónimo del inglés fibroblast specific protein-1
GSK-3β	Acrónimo del inglés Glycogen synthase kinase 3
HGF	Acrónimo del inglés Hepatocyte growth factor
HPLC	Acrónimo del inglés High-performance liquid chromatography
ICAM-1	Acrónimo del inglés Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IL-1	Acrónimo del inglés interleukin 1
IL-10	acrónimo del inglés Interleukin 10
IL-1β	Acrónimo del inglés interleukin 1 β
IL-8	Acrónimo del inglés interleukin 8
ILK	Acrónimo del inglés Integrin-linked kinase
Kcp	Acrónimo del inglés kielin chordin like protein
Kg	Quiliogramo
ml	Mililitro
MMP	Acrónimo del inglés Matrix metalloproteinases
mRNA	Acrónimo del inglés Messenger RNA
NF-κβ	Acrónimo del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogramo
PCR	Acrónimo del inglés polymerase chain reaction
PD	Acrónimo del inglés Peritoneal dialysis
PDGs	Productos de degradación de la glucosa
pg	Picogramo
PGE2	Acrónimo del inglés <u>prostaglandin</u> E2
PPAR-γ	Acrónimo del inglés peroxisome proliferator-activated receptor γ
RAGEs	Acrónimo del inglés receptor of advanced glycation end products
rhBMP-7	Acrónimo del inglés recombinant human bone morphogenetic protein 7
RNA	Acrónimo del inglés Ribonucleic acid
RSG	Rosiglitazona

Abreviaturas

RT-PCR	Acrónimo del inglés real time polymerase chain reaction
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
TGF- β 1	Acrónimo del inglés transforming growth factor β 1
TNF- α	Acrónimo del inglés tumor necrosis factor α
ufp	Unidades formadoras de placa
USAG-1	Acrónimo del inglés uterine sensitization associated gene-1
VEGF	Acrónimo del inglés vascular endotelial growth factor
α -SMA	Acrónimo del inglés α smooth muscle actin

Peritoneal dialysis is a renal replacement strategy based on the use of the peritoneum as a semi-permeable membrane across which ultrafiltration and diffusion take place. During peritoneal dialysis, the peritoneum is exposed to bioincompatible dialysis fluids that cause denudation of mesothelial cells and, ultimately, tissue fibrosis and failure of ultrafiltration. The high concentration of glucose and glucose degradation products in standard peritoneal dialysis fluids induce a local diabetic environment, which leads to the formation of advanced glycation end products (AGEs) that have an important role in peritoneal membrane deterioration. The long-term exposure to the dialysis fluids causes an inflammation process and the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of the mesothelial cells. This process is associated with peritoneal membrane failure.

In this study we used a rat model and developed a mouse model of peritoneal dialysis that help us to test the inflammation and the EMT as therapeutic targets in the peritoneal deterioration caused by the peritoneal dialysis treatment. These animal models were accompanied with *in vitro* and *ex vivo* experiments, that serve us to know the molecular mechanism of the different therapeutic approach that we used.

First of all, we study the role of Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7). This protein antagonizes transforming growth factor TGF- β 1, modulates EMT and protects against fibrosis. Herein, we analyzed the modulating role of BMP-7 on EMT of mesothelial cells *in vitro* and its protective effects in a rat peritoneal dialysis model. The data point to a balance between BMP-7 and TGF- β 1 in the control of EMT and indicate that blockade of EMT may be a therapeutic approach to ameliorate peritoneal membrane damage during peritoneal dialysis.

Because cyclooxygenase-2 (Cox-2) is induced by inflammation, we studied the role of Cox-2 in the deterioration of the peritoneal membrane. Herein, we demonstrate that Cox-2 is upregulated during the EMT of mesothelial cells and that peritoneal transport rate correlates with Cox-2 expression *ex vivo*. We also show that Cox-2 inhibition does not prevent EMT *in vitro* but ameliorates peritoneal membrane worsening *in vivo* in a mouse model of peritoneal dialysis fluid exposure. The data point to Cox-2 as key player in the setting and maintenance of peritoneal inflammation and reveal anti-inflammatory therapy as a strategy to preserve peritoneal membrane integrity in patients in peritoneal dialysis.

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) agonists are used to treat type II diabetes and they have beneficial effects on inflammation, fibrosis, and angiogenesis. Hence, we evaluated the efficacy of the PPAR- γ agonist rosiglitazone (RSG) in ameliorating peritoneal membrane damage in a mouse peritoneal dialysis model, and we analyzed the mechanisms underlying the protection offered by RSG. According to the data, RSG appears to produce pleiotropic protective effects on the peritoneal membrane by reducing the accumulation of AGEs and inflammation, and by preserving the mesothelial cells monolayer, highlighting the potential of PPAR- γ activation to ameliorate peritoneal deterioration in peritoneal dialysis patients.

Transforming growth factor (TGF)- β 1 is a well-characterized inducer of EMT and has been proposed to be a master molecule in PD fluid-induced peritoneal membrane deterioration. Hence, we evaluated the efficacy of TGF- β 1 blocking peptides in modulating EMT *in vitro* and *in vivo*, and in ameliorating peritoneal damage in a mouse peritoneal dialysis model. The results demonstrate that TGF- β 1 has a major role in the peritoneal deterioration induced by dialysis fluids and highlight TGF- β 1-mediated EMT as key process in the patho-physiology of the peritoneal dysfunction.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Diálisis peritoneal

El fallo renal (o insuficiencia renal) se produce cuando un paciente presenta una función renal menor al 10 ó 15 por ciento. Para continuar con vida debe someterse a uno de los siguientes tratamientos:

- Trasplante de riñón: donde quirúrgicamente colocan un riñón saludable de una persona a otra. El riñón donado hace el trabajo que hacían los dos riñones anteriormente.
- La hemodiálisis: que limpia y filtra la sangre usando una máquina para que temporalmente elimine los desechos dañinos, la sal y el agua extra del cuerpo. La hemodiálisis ayuda a controlar la presión en la sangre y ayuda a mantener el balance apropiado en el cuerpo de las sustancias químicas tales como el potasio, sodio, calcio y bicarbonato.
- La diálisis peritoneal: que es otro procedimiento que remueve el agua extra, desechos y químicas del cuerpo. Este tipo de diálisis usa las paredes del abdomen para filtrar la sangre. A esta pared se le llama membrana peritoneal y actúa como riñón artificial.

La diálisis peritoneal es una exitosa alternativa a la hemodiálisis, diversos estudios han confirmado su equivalencia, al menos durante los primeros 4/5 años del tratamiento, con respecto a la mortalidad y balance de fluidos (Fenton *et al.*, 1997). Como se ha comentado, se trata de una terapia de reemplazo renal que trabaja con el principio de que la membrana peritoneal que rodea la cavidad peritoneal y los órganos que en ella se encuentran, puede actuar como una membrana semipermeable natural. Utilizando el principio físico de la diálisis (difusión de sustancias cristaloides a través de una membrana semipermeable) se introduce en la cavidad peritoneal un líquido de diálisis especialmente formulado, que tras un tiempo de permanencia, es capaz de extraer los productos de desecho de la sangre. El exceso de líquido del cuerpo también puede ser eliminado por ósmosis, alterando la concentración del

agente osmótico que contiene el líquido de diálisis. De este modo, se consigue reemplazar la función renal.

El líquido de diálisis se infiltra a través de un catéter de diálisis peritoneal (figura 1). Este catéter se coloca en el abdomen del paciente, corriendo desde el peritoneo y saliendo hacia la superficie cerca del ombligo. Los catéteres peritoneales de diálisis también pueden estar en un túnel bajo la piel y salir en lugares alternativos como cerca del margen de la costilla o el esternón o aún subir cerca de la clavícula. El catéter es implantado mediante una pequeña cirugía. El sitio de salida se selecciona basándose en la preferencia del cirujano o del paciente, teniéndose también en cuenta cuestiones de anatomía o higiene.

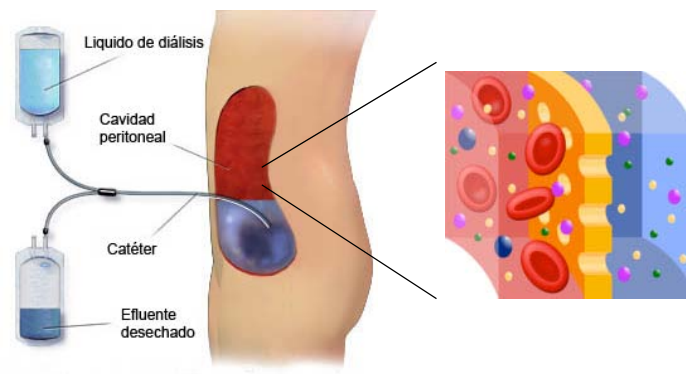


Figura 1. Esquema diálisis peritoneal

La diálisis peritoneal se realiza normalmente en el hogar o en el lugar de trabajo del paciente, aunque puede hacerse casi en cualquier parte. Todo lo necesario es: un área limpia para trabajar, una manera de elevar la bolsa del líquido de diálisis y un método para calentar su contenido.

Existen varias formulas de líquidos de diálisis. En la actualidad existe una carrera tecnológica entre las diversas compañías productoras para encontrar un líquido biocompatible que permita realizar el tratamiento a los pacientes durante largo tiempo, sin causar complicaciones a la salud de los mismos (Ter Wee *et al.*, 2007). En la tabla 1 se puede observar la composición de los líquidos más comunes usados en la actualidad en la práctica clínica. Todos ellos presentan un agente osmótico diluido en una solución tampón. Los

líquidos son hiperosmóticos o no con respecto a la sangre, dependiendo de la cantidad de agua que el paciente necesite eliminar. El agente osmótico más comúnmente usado es la glucosa. Debido a ello, y como consecuencia del proceso de esterilización, se forman productos de degradación de la glucosa (PDGs), los cuales se pueden encontrar en grandes concentraciones en los líquidos de diálisis. La caramelización de la glucosa y formación de PDGs disminuye cuando lo hace el pH, por ello estas soluciones de diálisis suelen presentar pHs ácidos (en torno al 5,5). A pesar de esto, dada la alta concentración de glucosa de partida, los líquidos de diálisis presentan altas concentraciones de PDGs. Tanto la glucosa, como los PDGs, y el pH ácido son tóxicos e irritantes para las células que son bañadas en el peritoneo. Los PDGs causan la formación de otros productos tóxicos como los productos de Amadori y finalmente dan lugar a los productos finales de glicosilación avanzada, conocidos como AGEs (siglas en inglés de Advanced glycation end-product) (Schwenger *et al.*, 2006). Estos se unen a sus receptores denominados RAGEs, los cuales disparan una señal pro-inflamatoria (Boulanger *et al.*, 2002 y 2007). Por lo tanto, todos estos factores, inducen un proceso inflamatorio, que puede verse muy exacerbado debido al carácter diario y continuo del tratamiento. Todo ello conlleva a un estado de daño e inflamación crónico, que desencadena la pérdida de la monocapa mesotelial, la fibrosis y el aumento de la capilaridad. Estos cambios estructurales pueden incidir gravemente en la salud del paciente, así como inducir un mal funcionamiento del proceso dialítico, conocido como fallo de ultrafiltración (incapacidad para lograr el equilibrio adecuado de líquidos). Es por ello que recientemente se han desarrollado nuevos líquidos de diálisis con propiedades más biocompatibles. Son aquellos que presentan bajas concentraciones de PDGs o que emplean como agente osmótico icodextrina o aminoácidos.

El funcionamiento de la membrana peritoneal se estima a través de la medida del coeficiente de masa de transferencia de creatinina. Se realiza gracias al test de equilibrio peritoneal (PET), en el cual se mide cuanta glucosa se absorbe, desde la solución de diálisis y cuanta creatinina ha migrado a dicha solución durante un intercambio de 4 horas. Aquellos pacientes en los que la transferencia de creatinina se produce rápidamente (llamados altos

transportadores) existe una mayor dificultad para retirar el exceso de agua del cuerpo, son los que presentan fallo de ultrafiltración (fallo de membrana).

Fabricante	Solución	Bolsa	Agente osmótico	Tampón	Calcio	PDGs	pH
BAXTER	Dianeal PD1	Simple	Glucosa 1.36 – 2.27 – 3.86 %	Lactato 35 mmol/L	1.75 mmol/L	Si	5.2
	Dianeal PD4	Simple	Glucosa 1.36 – 2.27 – 3.86 %	Lactato 40 mmol/L	1.25 mmol/L	Si	5.2
	Extaneal	Simple	Icodextrina 7.5 %	Lactato 40 mmol/L	1.75 mmol/L	No	5.6
	Nutrineal	Simple	Aminoácidos 1.1 %	Lactato 40 mmol/L	1.25 mmol/L	No	5.5
	Physioneal 35	Doble	Glucosa 1.36 – 2.27 – 3.86 %	Lactato 10 mmol/L + Bicarbonato 25 mmol/L	1.75 mmol/L	No	7.4
	Physioneal 40	Doble	Glucosa 1.36 – 2.27 – 3.86 %	Lactato 15 mmol/L + Bicarbonato 25 mmol/L	1.25 mmol/L	No	7.4
FRESENIUS	Stay Safe 2 – 3 – 4	Simple	Glucosa 1.5 – 2.3 – 4.25 %	Lactato 35 mmol/L	1.75 mmol/L	Si	5.5
	Stay Safe 17 – 18 – 19	Simple	Glucosa 1.5 – 2.3 – 4.25 %	Lactato 35 mmol/L	1.25 mmol/L	Si	5.5
	Balance 2 – 3 – 4	Doble	Glucosa 1.5 – 2.3 – 4.25 %	Lactato 35 mmol/L	1.75 mmol/L	No	7- 7.4
	Balance 17 – 18 – 19	Doble	Glucosa 1.5 – 2.3 – 4.25 %	Lactato 35 mmol/L	1.25 mmol/L	No	7- 7.4
	BicaVera 2 – 3 – 4	Doble	Glucosa 1.5 – 2.3 – 4.25 %	Bicarbonato 34 mmol/L	1.75 mmol/L	No	7.4
GAMBRO	Gambrosol Trio 10 A – B – A+B	Triple	Glucosa 1.5 – 2.5 – 3.9 %	Lactato 35 mmol/L	1.79- 1.75-1.70 mmol/L	No	5.5- 6.5
	Gambrosol Trio 40 A – B – A+B	Triple	Glucosa 1.5 – 2.5 – 3.9 %	Lactato 41 – 40 – 39 mmol/L	1.38- 1.35-1.31 mmol/L	No	5.5- 6.5

Tabla 1. Composición de los líquidos de diálisis comúnmente usados en la práctica clínica

Como resultado del tratamiento de la diálisis peritoneal, el peritoneo sufre una serie de alteraciones morfológicas que se ilustran en la figura 2. Un peritoneo normal posee una poblada monocapa de células mesoteliales, unidas a un ligero suelo de tejido conjuntivo en el que se pueden encontrar algunos fibroblastos residentes (Jimenez-Heffernan *et al.*, 2004). Más interiormente se hallan las capas musculares, en las que se encuentran los capilares. En un peritoneo que ha sufrido por un largo periodo de tiempo el tratamiento de diálisis peritoneal, nos encontramos con que la membrana mesotelial se encuentra despoblada y el tejido conectivo posee una gran potencia, debido a la acumulación de fibrosis. Esto es debido a la exacerbada producción de componentes de matriz extracelular. Además, en el tejido conectivo se aprecian una gran cantidad de fibroblastos, así como la presencia de capilares.

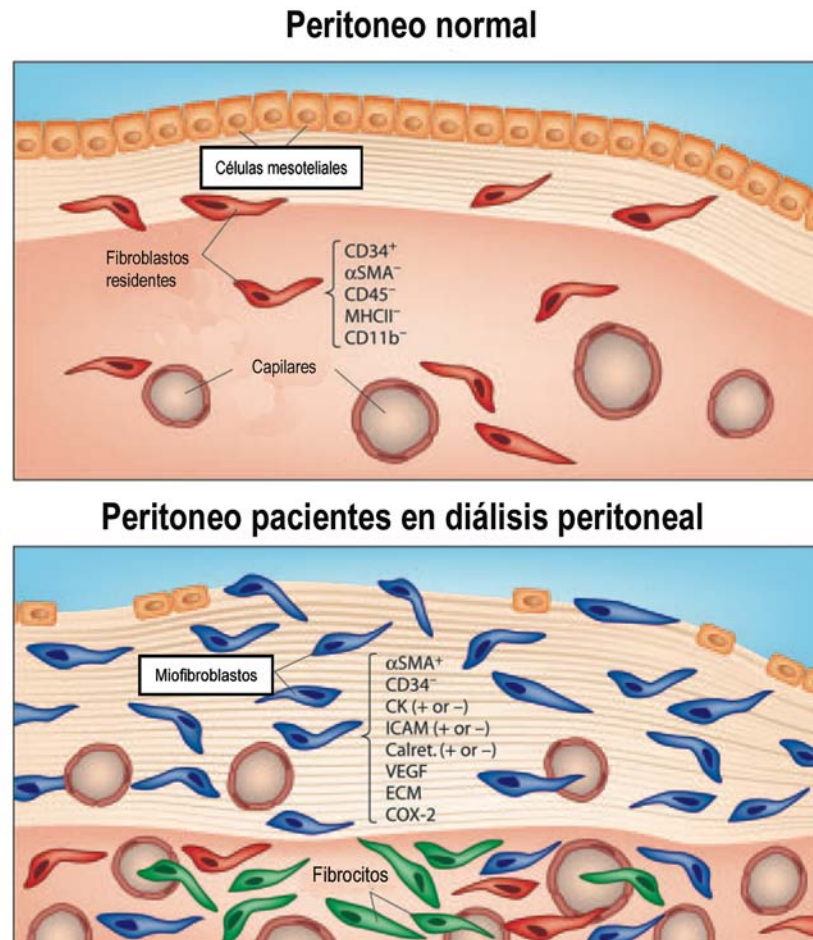


Figura 2. Cambios en el peritoneo causados por la diálisis peritoneal

3.2. Estructura del peritoneo

Hace poco más de cien años, Robinson (1897), resumiendo varios siglos de investigación sobre el peritoneo, definió sus funciones biológicas básicas: vehículo de conducción de vasos e inervación para los órganos abdominales y, al mismo tiempo, proporción de una superficie lubricada con el propósito de minimizar la fricción derivada de los movimientos viscerales. El tratamiento de la diálisis peritoneal, revelada como una terapia efectiva como tratamiento de la uremia crónica (Tenckhoff *et al.*, 1968; Popovich *et al.*, 1976; Nolph *et al.*, 1980), estimuló de forma marcada la investigación sobre el peritoneo. En efecto, el empleo de esta serosa, como membrana biológica reusable para

efectuar diálisis crónica, creó la necesidad de obtener un conocimiento más profundo y detallado de sus características.

El peritoneo es una membrana serosa formada por tejido conectivo, forrado en su cara cavitaria por un estrato monocelular de células mesoteliales. La monocapa de células mesoteliales descansa sobre una lámina basal. Debajo de ésta se encuentra la zona compacta (zona submesotelial), en el margen de la cual se encuentran bandas discontinuas de fibras de elastina, lo que otorga a la membrana su elasticidad. Dentro de ésta región se encuentran entretejidos diversos paquetes de fibras de colágeno embebidas en el estroma conectivo. Este intersticio parece estar compuesto mayormente por glicoproteínas y proteoglicanos, aunque su composición precisa sigue siendo desconocida. Dentro del intersticio submesotelial se encuentran ocasionalmente fibroblastos y mastocitos, así como vasos linfáticos. El peritoneo se estructura en tres partes (figura 3): la capa exterior, llamada peritoneo parietal, está adherida a la pared abdominal y la capa interior, peritoneo visceral, envuelve los órganos situados dentro de la cavidad abdominal. El espacio entre ambas capas se denomina cavidad peritoneal y contiene una pequeña cantidad de fluido lubricante (alrededor de 50 ml) que permite a ambas capas deslizarse entre sí. La mayor parte de los órganos abdominales están adheridos a la pared abdominal por el mesenterio, una parte del peritoneo a través de la cual los órganos son alimentados por los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios.

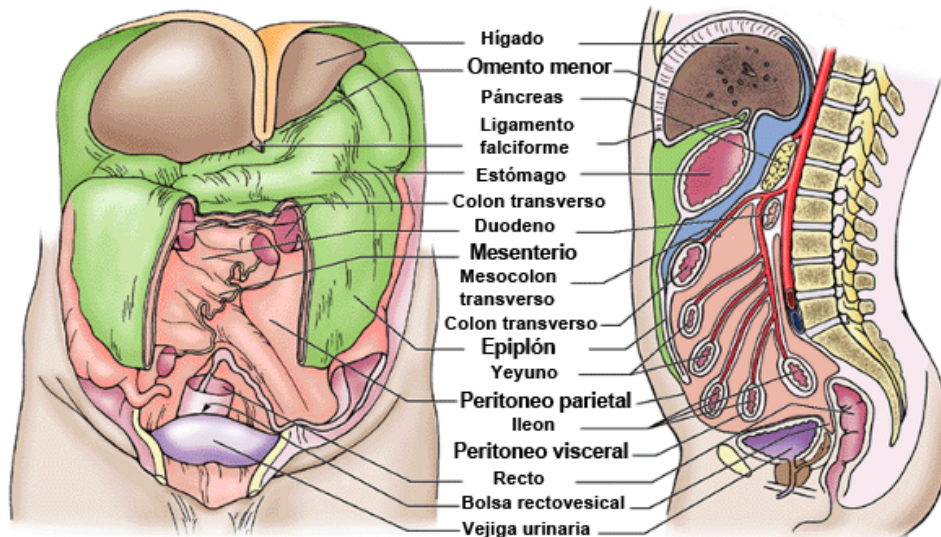


Figura 3. Estructura del peritoneo

En humanos, existe una estructura dentro del peritoneo visceral llamada omentum que puede dividirse en dos partes, el omentum (gastrocólico) mayor (también conocido como epiplón) y el omentum (gastrohepático) menor, conteniendo ambas un doble pliegue de peritoneo y una cavidad (la bolsa omental o cavidad peritoneal menor). El omentum menor está adherido a la curva inferior del duodeno e hígado. El epiplón cuelga de la curva interior del estómago y se curva hacia arriba por delante de los intestinos para luego volver a curvarse en sentido descendente y adherirse al colon transversal. De hecho está solapado por delante del intestino como un delantal y sirve como capa aislante y protectora.

Con respecto a su origen, cabe citar que a medida que el embrión se desarrolla, los diferentes órganos crecen en la cavidad, partiendo de estructuras en la pared abdominal. Durante este proceso comienzan a ser envueltos por una capa de peritoneo y los vasos sanguíneos en formación que se alimentan de esta pared son envueltos por la parte del peritoneo que formará el mesenterio. En situaciones anatómicas en las cuales esta capa celular aparece plegada, como en los epiplones y en el mesenterio, ambas caras cavitarias del pliegue son cubiertas por la lámina mesotelial.

La superficie anatómica del peritoneo en adultos ha sido estimada en un número limitado de estudios, y oscila entre 2,08 y 1,72 m², mostrando una

proporción de área/peso corporal de aproximadamente 0,284 (Robinson, 1897; Tenckhoff *et al.*, 1968). Cabe resaltar que el mesenterio brinda aproximadamente la mitad de la superficie anatómica total. Desde el punto de vista funcional, parece probable que la superficie peritoneal en contacto con las soluciones de diálisis sea substancialmente menor que la superficie anatómica. Este concepto definido por Krediet (1994) como área peritoneal efectiva, ha sido ratificado por Chagnac (1999), quien demostró en pacientes que la superficie peritoneal promedio activamente envuelta en el proceso de diálisis peritoneal es de 0,55-0,04 m², es decir, aproximadamente un tercio del área total medida en estudios anatómicos. Conclusiones similares fueron derivadas de estudios efectuados en ratas (Flessner *et al.*, 1996).

3.3 Patogénesis asociada a la diálisis peritoneal

El primer proceso dañino que tiene lugar en el peritoneo como respuesta al tratamiento de la diálisis peritoneal es la inflamación. La exposición a líquidos bioincompatibles y episodios de infecciones bacterianas y fúngicas o hemoperitoneo (presencia de sangre en la cavidad peritoneal) induce situaciones de inflamación crónica aguda que causan daño sobre el tejido peritoneal. La reparación exitosa del tejido lesionado requiere una respuesta muy controlada para limitar las alteraciones estructurales. La respuesta peritoneal al daño y/o infección implica, además de a otras células, a las células mesoteliales y a los macrófagos residentes que trabajan de manera coordinada para reclutar otras células inflamatorias, incluyendo a fagocitos mononucleares, linfocitos y neutrófilos (Topley *et al.*, 1996). Las células mesoteliales y del sistema inflamatorio, que se infiltran en el peritoneo, pueden producir un gran espectro de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas. Se establece así una red compleja que se retroalimenta, resultando en una inflamación crónica, que conlleva al deterioro de la membrana (Topley *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 18; Visser *et al.*, 1998). Muchos de estos mediadores inflamatorios, como TNF- α , IL-1, IL-8, TGF- β 1 y FGF-2, pueden tener un papel en la fibrosis peritoneal. Esto es debido a que son capaces de estimular la proliferación de fibroblastos residentes, y la deposición de componentes extracelulares (Masunaga *et al.*,

2003), así como la conversión fibroblástica de las células mesoteliales (Yañez-Mo *et al.*, 2003). De este modo se aumenta el número de células productoras de matriz extracelular (Jimenez-Heffernan *et al.*, 2004). Además, IL-8, FGF-2, y especialmente VEGF, pueden inducir e incrementar la vascularización, tanto en número como en la permeabilidad de los vasos (Aroeira *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2004). Todo ello provoca un incremento del transporte de solutos pequeños, que es característico del fallo de ultrafiltración.

Incluso en ausencia de infección o hemoperitoneo, es conocido que los pacientes en diálisis peritoneal tienen una pequeña inflamación crónica que promueve alteraciones estructurales en la membrana peritoneal. Esto puede ser debido a daños mecánicos durante los cambios de fluido en diálisis peritoneal y también a la composición no fisiológica de los mismos. La exposición prolongada del peritoneo a la glucosa, el agente osmótico más común de las soluciones de diálisis, o a los productos de Amadori, formados por la condensación entre la glucosa y el grupo amino de las proteínas, induce la síntesis de productos inflamatorios, fibrogénicos y angiogénicos por los macrófagos (Wen *et al.*, 2006) y las células mesoteliales (Nevado *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1995). La glucosa puede promover también la inflamación peritoneal a través de un mecanismo dependiente de la leptina (Axelsson *et al.*, 2006). En este contexto, los adipocitos peritoneales expuestos a la glucosa producen leptina, la cual es capaz de promover la síntesis de TGF- β 1 por parte de las células mesoteliales (Leung *et al.*, 2006). Esta evidencia sugiere que la inflamación peritoneal es un proceso clave en el fallo de ultrafiltración; por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos que están implicados en esta regulación puede ser muy útil en el diseño de intervenciones terapéuticas.

Otra acción desencadenada por el proceso inflamatorio es la gran acumulación de fibrosis, causada por una exacerbada producción de matriz extracelular en el peritoneo (Masunaga *et al.*, 2003). Existen dos tipos patológicos de fibrosis peritoneal. La más común es la esclerosis peritoneal, ya que aparece en la mayoría de los pacientes sometidos a diálisis peritoneal. El grado de fibrosis en este caso es normalmente leve y muestra una correlación con el tiempo en diálisis (Di Paolo *et al.*, 2000). El otro tipo de fibrosis es la esclerosis peritoneal encapsulante, que es una forma de esclerosis poco común que se desarrolla

rápidamente con una intensa fibrosis, inflamación y depósitos de fibrina. Es una fibrosis que puede causar la muerte del paciente y en muchos casos conlleva a un encapsulamiento de los órganos. Es capaz de progresar incluso cuando el paciente abandona el tratamiento de diálisis peritoneal (Krediet *et al.*, 1999 y 2000; Gokal *et al.*, 2000).

3.4. Células mesoteliales: víctimas, espectadoras o culpables

Desde un principio, las células que se proponían como orquestantes de los cambios estructurales y funcionales en el peritoneo, como consecuencia del tratamiento de diálisis peritoneal, fueron las diversas células del sistema inmune así como los fibroblastos. Por el contrario, las células mesoteliales fueron consideradas meras espectadoras o incluso víctimas de los cambios ocasionados, ya que la membrana que forman puede llegar a desaparecer por completo, en aquellos pacientes que presentan los cambios más drásticos (Krediet *et al.*, 1999). Esta noción sufrió un cambio con el descubrimiento de que las células mesoteliales son capaces de sufrir una transformación fenotípica desde su típico aspecto epitelioide hasta alcanzar una apariencia de carácter fibroblastoide (Yañez-Mo *et al.*, 2003). Este proceso recibe el nombre de transición epitelio-mesenquimal (TEM), y es común a otros tipos celulares, tanto en otros procesos de fibrosis-reparación (Kalluri *et al.*, 2003; Liu, 2004), como dentro de los estadios de desarrollo (Erik *et al.*, 2005) y metástasis (Thiery *et al.*, 2009). El hecho de que las células mesoteliales sufran TEM durante el tratamiento de la diálisis peritoneal fue publicado en el año 2003 (Yañez-Mo *et al.*, 2003), marcando un antes y un después en la comprensión de los fenómenos que ocurrían en el peritoneo como consecuencia del tratamiento de esta terapia de reemplazo renal.

El cambio de una célula epitelial a una de tipo mesenquimal es un proceso complejo que requiere alteraciones tanto en arquitectura celular, como en comportamiento, así como una profunda reprogramación con nuevas instrucciones bioquímicas (Kalluri *et al.*, 2003; Liu, 2004; Thiery *et al.*, 2006). Como se ilustra en la figura 4, la TEM comienza con la disociación de las uniones intercelulares, como resultado de la disminución en la expresión de

moléculas de adhesión como la E-cadherina, claudinas, ocludinas, zona occludens-1 y desmoplaquina, y con la pérdida de microvellosidades y polaridad basolateral. Entonces, las células adoptan una polaridad delante-atrás, como resultado de una reorganización del citoesqueleto, y adquieren expresión de FSP1 incrementando su capacidad migratoria. En los últimos estadios de la TEM, las células adquieren la capacidad de degradar la membrana basal y de invadir el estroma fibrótico mediante un aumento en la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP). Otros marcadores de TEM comúnmente usados, incluyen la bajada de expresión de citoqueratinas; la subida de vimentina, N-cadherina y el factor de transcripción Snail, así como el incremento de la producción de componentes de matriz extracelular. Además de estos marcadores clásicos, existen otros, así como una serie de cambios bioquímicos que definen la TEM (resumidos en la tabla 2). La TEM puede ser llevada a cabo fácilmente por una combinación de un amplio espectro de estímulos extracelulares, incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, AGEs, MMP y componentes de matriz extracelular, como el colágeno I. Debe saberse que una gran cantidad de estos factores de la TEM se han estudiado e identificado en condiciones de cultivo celular *in vitro*, en las cuales las células epiteliales son tratadas con factores purificados, solos o en combinación, a altas concentraciones. Estos estudios fraccionados, aunque necesarios para definir el papel potencial individual de cada factor en la regulación de la TEM, no mimetizan la situación real *in vivo*, en donde los reguladores de la TEM están presentes a bajas concentraciones y en combinaciones muy complejas. Además una TEM *in vivo* resulta de una integración de diversas señales llevadas a cabo por diferentes factores, siendo difícil la asignación de jerarquías.

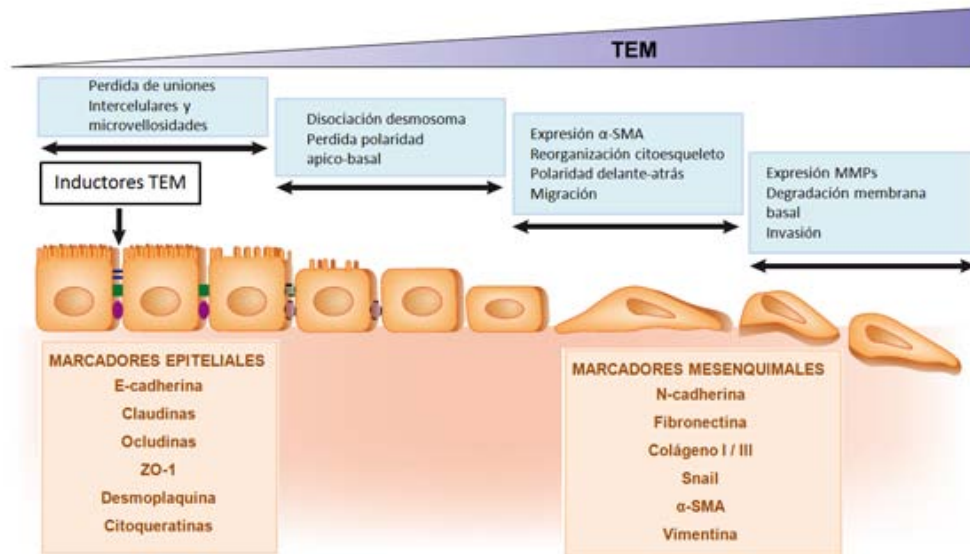


Figura 4. Transición epitelio-mesénquima de las células mesoteliales

La señalización mediante receptores en respuesta a estos factores dispara la activación de una compleja red de señales moleculares, como las GTPasas Ras/Rho, la quinasa Rho-activada, tirosinquinasa Src, ILK, Wnt-1, Smad 2 y 3, las proteínas quinasas activadoras de mitogenesis p38, y la quinasa fosfatidilinositol-3 (Tabla 2). Estos factores orquestan la disociación de los complejos de adhesión intercelular, cambios en la organización del citoesqueleto, y la adquisición de la capacidad migratoria e invasiva que tienen lugar durante la TEM. La diana central de algunas de estas vías de señalización es la glicógeno-sintasa quinasa- β (GSK- β), que se encarga de fosforilar a β -catenina y al factor de represión Snail, conduciendo a su degradación en el proteosoma. La fosforilación de GSK- β mediante quinasas reguladas por señalización extracelular, ILK, Wnt-1, o la quinasa fosfatidilinositol-3, conlleva su inhibición funcional. Como resultado, la β -catenina es estabilizada y localizada en el núcleo, donde alimenta la señalización Wnt mediante la interacción con el estimulador linfocitario celular factor-1/T. Además, la inhibición de GSK- β conduce a la estabilización y translocación nuclear de Snail, un potente represor transcripcional de E-cadherina, así como de otras moléculas de adhesión intercelular, e inductoras del arresto del ciclo celular y supervivencia. La regulación de señales moleculares también resulta en la activación y translocación nuclear de otros factores de transcripción, como Smads 2 y 3, NF- κ B y ligand-bound FGF

receptor 1, que en conjunción con la β -catenina, factor-1/T estimulador linfoide, y Snail, reprimen la expresión de marcadores epitelioides y entablan el transcriptoma de la TEM.

<u>Promotores de TEM</u>	<u>Proteínas sobreexpresadas</u>	<u>Proteínas en el núcleo</u>
<i>TGF-β1</i>	<i>N-Cadherina</i>	<i>B-catenina</i>
<i>FGF-2</i>	<i>Snail</i>	<i>LEF1/TCF</i>
<i>EGF</i>	<i>Vimentina</i>	<i>Snail</i>
<i>Ang II</i>	<i>TGF-β1</i>	<i>NF-κB</i>
<i>PDGF</i>	<i>Fibronectina</i>	<i>FGF-2/FGFR-1</i>
<i>IL-1</i>	<i>Colágeno I/III</i>	<i>Reguladores negativos</i>
<i>AGE</i>	<i>α-SMA</i>	<i>Smad co-represores</i>
<i>MMP-2 y 3</i>	<i>FGF-1 y 2</i>	<i>Smad-5</i>
<i>Colágeno I</i>	<i>MMP-2 y 9</i>	<i>Smad-7</i>
<u>Proteínas activadas</u>	<i>FSP-1</i>	<u>Cambios celulares</u>
<i>ILK</i>	<i>PAI-1</i>	<i>Polaridad delante-atrás</i>
<i>Wnt</i>	<u>Proteínas reprimidas</u>	<i>Incremento en migración</i>
<i>MAPK</i>	<i>E-cadherina</i>	<i>Incremento en invasión</i>
<i>PI3-K</i>	<i>Citoqueratinas</i>	<i>Disminución fibrinólisis</i>
<i>SIC</i>	<i>Claudinas</i>	<i>Arresto de crecimiento</i>
<i>Ras/Rho GTPasas</i>	<i>Ocludinas</i>	<i>supervivencia</i>
<i>ROCK</i>	<i>Desmoplaquina</i>	
<u>Proteínas inhibidas</u>	<i>ZO-1</i>	
<i>GSK-3β</i>	<i>Mucina-1</i>	
	<i>tPA</i>	

Tabla 2. Patrones moleculares y funcionales de la TEM

Es importante indicar que la TEM es un proceso reversible, al menos durante sus primeras etapas. Por lo tanto, existen moléculas capaces de regular negativamente la TEM y que promueven el proceso contrario (transición mesenquimo-epitelial). En este contexto, dos factores endógenos, el HGF y BMP-7, han demostrado ser capaces de bloquear y revertir la TEM mediante la inducción de la expresión de co-represores transcripcionales, en el caso del HGF, o de la activación de los Smads 1,5 y 8 en el caso del BMP-7. Estos interfieren con la señalización de la ruta de TGF- β 1, la cual actúa a través de los Smads 2 y 3. También se sabe que Smad-7 es otra molécula capaz de regular negativamente la TEM mediante el bloqueo de la fosforilación de Smad-2 y su consiguiente activación.

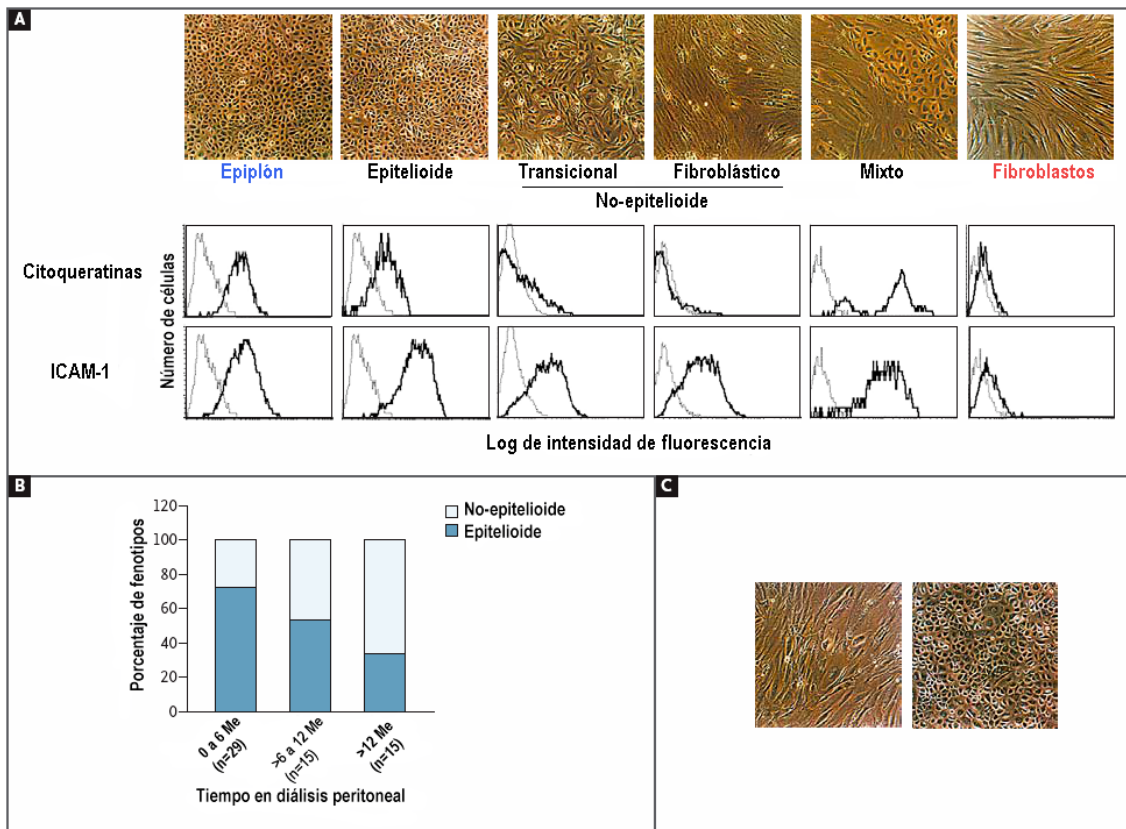


Figura 5. Cambios morfológicos de las células mesoteliales durante la diálisis peritoneal. (A) Se muestran fotografías de cultivos confluentes de células mesoteliales procedentes de epiplón (epiplón) o del efluente de pacientes en diálisis peritoneal. Estas últimas pueden presentar diversos fenotipos: epitelioides, transicional, fibroblástico o mixto. Por último, se muestra un cultivo de fibroblastos. Debajo de las fotografías se muestra el análisis de citometría de flujo de los marcadores citoqueratina e ICAM-1. Aumento 200 x. (B) Relación entre los cambios fenotípicos de los cultivos de células mesoteliales y el tiempo recibiendo diálisis peritoneal. (C) Imágenes de cultivos de células mesoteliales del mismo paciente, durante el curso de un episodio de hemoperitoneo (izquierda) y dos meses después del cese de la patología (derecha). Aumento 200 x.

3.5. Evidencias de TEM en diálisis peritoneal

La presencia de la TEM en el peritoneo de pacientes en diálisis peritoneal fue publicada por vez primera en un artículo en el año 2003 (Yañez-Mo *et al.*, 2003). En este trabajo se describe que los cultivos confluentes de las células mesoteliales extraídas de los efluentes de los pacientes en diálisis peritoneal, pueden mostrar morfologías epitelioides y no-epitelioides (figura 5). El segundo fenotipo se corresponde con células que han sufrido o al menos comenzado, el proceso de TEM. La frecuencia de las células mesoteliales no-epitelioides muestra una asociación con el tiempo en diálisis peritoneal, episodios de peritonitis y hemoperitoneo. Las células mesoteliales de efluentes muestran una alta expresión de ICAM-1 independientemente de su morfología. En contraste con esto, este marcador mesotelial, no es detectable en cultivos de

fibroblastos peritoneales, dando razón a la hipótesis de que las células no-epitelioides poseen un origen mesotelial y no son causados por una contaminación de fibroblastos (figura 5). El análisis de los marcadores epiteliales citoqueratina y E-cadherina es también importante para determinar de un modo más preciso la naturaleza de las células cultivadas de los efluentes de los pacientes en diálisis peritoneal. La alta expresión de citoqueratinas y E-cadherina ha sido observada sólo en células mesoteliales extraídas de omento, mientras que aquellas que proceden de los efluentes muestran una progresiva reducción en la expresión de estas moléculas, aunque incluso las células no-epitelioides mantienen subpoblaciones que presentan estos marcadores. Los fibroblastos sin embargo, son completamente negativos para estos dos marcadores. Los cambios fenotípicos de las células mesoteliales del efluente son indicativos de la TEM. Evidencias adicionales de que los cambios inducidos por la diálisis peritoneales en las células mesoteliales son debidos a la TEM, provienen del análisis de expresión del factor transcripcional Snail. Las células mesoteliales provenientes de omento no expresan mRNA de Snail, mientras una progresiva expresión de este mRNA ha sido observada en células mesoteliales extraídos de efluentes a lo largo del proceso de transdiferenciación (Yañez-Mo *et al.*, 2003). Además de estas moléculas, hay otros marcadores que pueden ayudar a distinguir células mesoteliales de efluentes, de contaminaciones de fibroblastos, así como a establecer los estadios de transdiferenciación de las células mesoteliales (tabla 3).

Marcador molecular	Epiplón	Efluente diálisis peritoneal		Fibroblastos
		Epiteliode	No-epiteliode	
E-cadherina	+++	+	-	-
N-cadherina	-	+	++	++
Snail (mRNA)	-	+/-	+++	+++
ICAM-1	+++	+++	+++	-
Citoqueratinas	+++	++	+/-	-
Vimentina	+	++	+++	+++
Calretinina	+++	++	+/-	-
CA 125	+++	+++	+++	-
VEGF	+	++	+++	-
COX-2	+	++	+++	-
Fibronectina	-	+	+++	+++
Colágeno I	-	+	+++	+++
α -SMA	-	+/-	++	++

Tabla 3. Marcadores moleculares de TEM

La conversión mesenquimal de las células mesoteliales puede ser también observada *in vivo* en el peritoneo, como respuesta de la diálisis peritoneal. El análisis inmunohistoquímico de biopsias peritoneales de pacientes sometidos a diálisis peritoneal revela la presencia de células de fenotipo fibroblástico embebidas en la zona compacta expresando marcadores mesoteliales (figura 6). Además, estas biopsias peritoneales muestran la expresión de α -SMA en el estroma fibrótico, especialmente en el nivel más alto, y en muchos casos estos miofibroblastos muestran co-expresión de citoqueratinas (Jimenez-Heffernan *et al.*, 2004). Estos resultados indican que las nuevas células miofibroblásticas surgen por conversión local de las células mesoteliales vía TEM durante el proceso de reparación que tienen lugar durante la diálisis peritoneal.

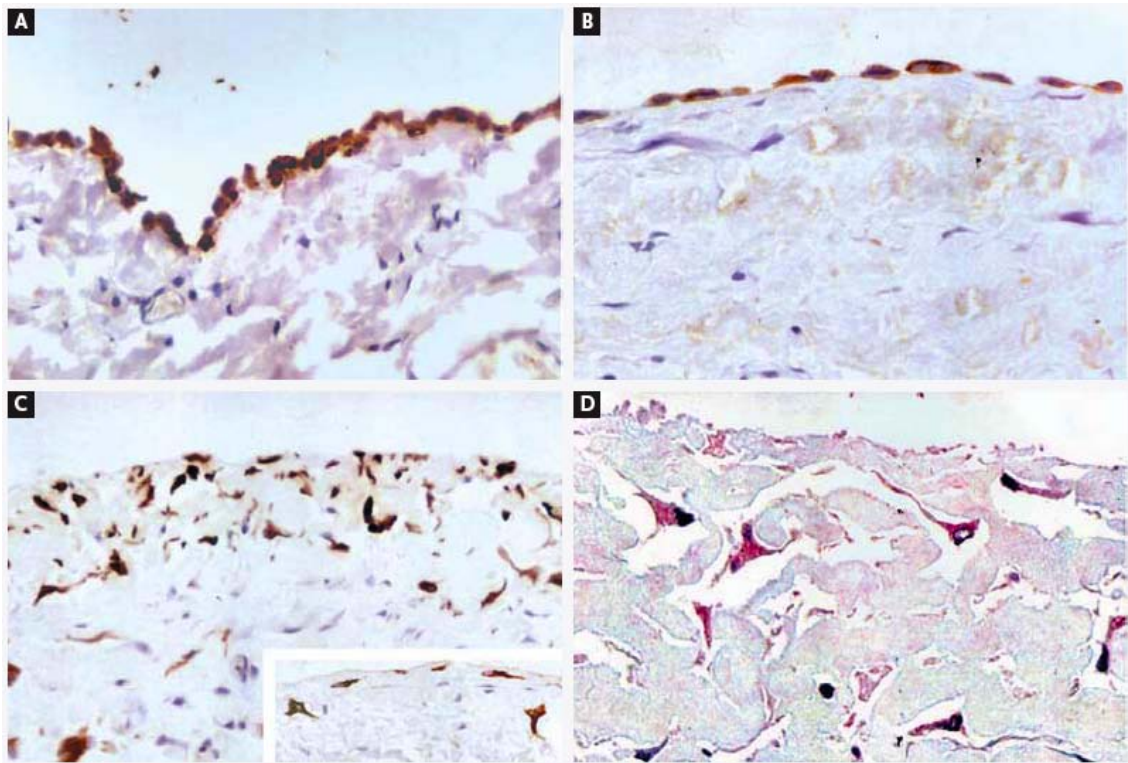


Figura 6. Evidencia de TEM de las células mesoteliales en peritoneo de pacientes sometidos a diálisis peritoneal. Las imágenes muestran el análisis mediante inmunohistoquímica, tiñendo con anticuerpos anti-citoqueratina (A-; Aumento 150 x) y anti-ICAM-1 (D; Aumento 180 x). (A) Peritoneo sano. (B) Paciente que llevaba en diálisis peritoneal 6 meses, ya presenta una pérdida de la polaridad de las células mesoteliales. (C) Paciente tras 8 meses recibiendo diálisis peritoneal, en el panel insertado inferior se muestra un paciente que lleva un total de 34 meses. En estos ya se observan células mesoteliales con fenotipo fibroblastoide. (D) Se muestra inmuno-tinción con ICAM-1 del mismo paciente mostrado en el panel C.

3.6. Papel patológico de la TEM en el fallo de la membrana peritoneal

Existen tres tipos de modificaciones estructurales del peritoneo, altamente asociadas con el fallo de ultrafiltración de los pacientes en diálisis peritoneal. Una de ellas es la acumulación de componentes de matriz extracelular, la fibrosis peritoneal. Las células mesoteliales parecen estar implicadas en este proceso, ya que tras sufrir TEM, se convierten en auténticas fábricas de producción de componentes de matriz extracelular. Una vez transdiferenciadas a fenotipo fibroblastoide, las células mesoteliales son capaces de producir grandes cantidades de colágeno I, así como de fibronectina, ambas proteínas de marcado carácter pro-fibrótico. Además, las células mesoteliales que sufren TEM expresan altos niveles de ciclooxygenasa-2 (Aroeira *et al.*, 2009) la cual esta implicada en remodelación tisular y procesos fibróticos (Turini *et al.*, 2002). Puede ser observado, que el grado de fibrosis peritoneal y la tasa de transporte

de pequeños solutos de los pacientes en diálisis peritoneal, correlaciona con la expresión de marcadores mesoteliales dentro del estroma fibrótico (Del Peso *et al.*, 2008). Estos resultados soportan la idea de que las células mesoteliales transdiferenciadas juegan un papel esencial en la iniciación de la fibrosis y el subsecuente declive funcional del peritoneo.

Otro de las importantes modificaciones estructurales es el aumento de la capilaridad, vasodilatación y vasculopatía del peritoneo (Sherif *et al.*, 2006). Ha sido propuesto que la producción local de VEGF durante la diálisis peritoneal juega un papel central en los procesos que desembocan en angiogénesis peritoneal y declive funcional (Aroeira *et al.*, 2005; Pecoits-Filho *et al.*, 2002; Zweers *et al.*, 1999). Por otro lado, la fuente principal de VEGF en los pacientes en diálisis peritoneal, así como los mecanismos que se encuentran implicados en la sobreexpresión de VEGF durante dicho tratamiento, siguen siendo desconocidos. Una serie de estudios han demostrado que las células mesoteliales derivadas de epiplón tienen la capacidad de producir VEGF *in vitro*, como respuesta a una diversidad de estímulos (Selgas *et al.*, 2000; Mandl-Weber *et al.*, 2002). Otro trabajo concluye que las células mesoteliales transdiferenciadas son una fuente importante de VEGF en pacientes en diálisis peritoneal y que el mecanismo desencadenante es la conversión mesenquimal de dichas células (Aroeira *et al.*, 2005). Se ha demostrado que las células mesoteliales con fenotipo fibroblástico producen mucho más VEGF *ex vivo* que las células mesoteliales con fenotipo mesotelial y que aquellos pacientes que drenan células mesoteliales con fenotipo fibroblástico (no-epitelioide) tienen mayores niveles sanguíneos de VEGF, que aquellos que drenan células mesoteliales con fenotipo epitelial. Además, ese mismo trabajo relata que existe una correlación entre los niveles de VEGF *ex vivo* e *in vivo* y la tasa de transporte peritoneal en pacientes en diálisis peritoneal (Aroeira *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren un papel directo y activo de las células mesoteliales no sólo en fibrosis, sino también en el desarrollo de la angiogénesis peritoneal.

El último cambio estructural, asociado al fallo de ultrafiltración, es la pérdida de la monocapa de las células mesoteliales. En este caso, las células mesoteliales pueden haber sufrido diferentes destinos. Por un lado, existe una porción que habrá muerto como consecuencia de la toxicidad del líquido de diálisis. Otras

células se habrán denudado al líquido de diálisis, una parte de las cuales serán posteriormente extraídas de la cavidad peritoneal a la bolsa receptora durante el proceso de diálisis peritoneal. Son estas células las que utilizamos para los experimentos *ex vivo*, cuando son extraídas de efluentes de los pacientes. En último término, existen otras células que habrán migrado al estroma submesotelial. Esto se ha constatado en biopsias del peritoneo de pacientes en diálisis, en las cuales pueden observarse células que presentan expresión de citoqueratina apareciendo en zonas submesoteliales (figura 5).

Todos estos datos sugieren que la TEM de las células mesoteliales puede presentar un papel crucial en el deterioro del peritoneo que tiene lugar como consecuencia del tratamiento con la diálisis peritoneal. Es por ello que la TEM se muestra como una diana terapéutica plausible, con el fin de paliar los efectos deletéreos que el tratamiento de la diálisis peritoneal ejerce sobre el peritoneo.

3.7. Modelos de TEM

Para estudiar el proceso de la TEM de las células mesoteliales como respuesta a la diálisis peritoneal hemos desarrollado varios modelos:

In vitro: Se emplean células mesoteliales extraídas de epiplón donado por pacientes, tras su previo consentimiento. Como estímulo de TEM se hace uso de TGF- β 1 (1 ng/ml), citoquina clásicamente empleada en este tipo de modelos *in vitro*.

Ex vivo: En los efluentes peritoneales de los pacientes, procedentes del intercambio dialítico, se hayan una gran cantidad de células. De entre todas ellas se aíslan las células mesoteliales, las cuales pueden presentar fenotipo epitelioides o no-epitelioides.

In vivo: Los modelos animales sirven básicamente para estudiar las enfermedades humanas: cómo se producen, cómo evolucionan y, sobre todo, cómo pueden ser tratadas. Primero se intenta reproducir en el animal la enfermedad en cuestión, de forma que se desencadena de la manera más

parecida a como lo hace en el ser humano. Por otra parte, en los modelos animales se aplican técnicas de análisis que no se podrían realizar en la especie humana por razones éticas. Por último, la aplicación de posibles medidas terapéuticas para aliviar o curar la enfermedad nos permitirá calibrar su eficacia o sus peligros antes de probarlas en la especie humana.

En este estudio se hizo uso en primer lugar de un modelo de rata de diálisis peritoneal (Hekking *et al.*, 2001), el cual sirvió como base para desarrollar el primer modelo de ratón de diálisis peritoneal (González-Mateo *et al.*, 2009). Como en cualquier modelo animal se intenta mimetizar en la medida de lo posible la patología humana. Para ello el líquido de diálisis es instilado en el interior de la cavidad peritoneal de los animales (ratas o ratones) a través de un catéter. En el caso de los pacientes, el catéter posee un extremo en la cavidad peritoneal y otro en el exterior del cuerpo del paciente. En los modelos animales se mantiene un extremo en el interior de la cavidad peritoneal, pero el otro se encuentra situado subcutáneamente, unido a una capsula, que es la que será inyectada diariamente (Figura 7). Dicha capsula se encuentra situada en el lomo del animal, aprovechando la piel sobrante que presentan tanto las ratas como los ratones en esta zona. El líquido es instilado diariamente mediante el uso de una jeringuilla con una aguja de punta Huber, especialmente diseñada para causar el menor daño posible al tejido atravesado, ya que posee en un lateral su orificio. De este modo el área de tejido dañado es la menor posible. Los animales empleados no presentan ningún tipo de anomalía renal, circunstancia que no es imprescindible para el estudio del daño peritoneal, ya que es la instilación del líquido la que produce el daño en el peritoneo y no la uremia (Zareie *et al.*, 2005). En estos modelos, el líquido no se retira de la cavidad del animal, permaneciendo en el peritoneo hasta que es absorbido en su totalidad. Debido a esta característica es más correcto considerarlos modelos de exposición a líquido de diálisis en lugar de modelos de diálisis peritoneal. El día de sacrificio del animal es el único en el que se recoge el líquido, que servirá para realizar diferentes análisis.



Figura 7. Modelos animales de exposición a líquido de diálisis. (a-c) Modelo de rata. (a) Bomba de acceso conectada a catéter. (b) Catéter subcutáneo peritoneal. (c) Inyección a través de la bomba de acceso, localizada en el lomo del animal. (d) Esquema de la inyección a través de la bomba de acceso. (e-f) Modelo de ratón. (e) Implantación quirúrgica del catéter en el peritoneo. (f) Ratones 2 horas después de la operación.

Los daños ocasionados por el tratamiento mimetizan lo que ocurre en pacientes. El peritoneo de un animal tratado presenta fibrosis, angiogénesis y pérdida de la monocapa mesotelial (González-Mateo *et al.*, 2009). También se observa una pérdida de la capacidad dialítica del peritoneo, así como un exacerbado proceso inflamatorio. Así mismo, se ha observado TEM de las células mesoteliales en ambos modelos murinos (Aroeira *et al.*, 2008; Loureiro *et al.*, 2010), por lo que parece que se mimetizan en gran medida los procesos que tienen lugar en el peritoneo de los pacientes sometidos a diálisis peritoneal.

3.8. Intervención terapéutica de la TEM

Desde que se descubrió que la TEM presenta un papel importante en el desarrollo de la remodelación tisular asociada a fibrosis, se ha iniciado una búsqueda de moléculas capaces de regular este proceso. Desde el punto de vista clínico de un nefrólogo, el aspecto más importante es la identificación de la TEM de las células mesoteliales, como un evento clave en el fallo de ultrafiltración, ya que este proceso puede ser modificado con un amplio rango de agentes farmacéuticos (Liu, 2004). La terapia estratégica puede ser

designada para prevenir o revertir la TEM por si misma o tratar sus efectos, como son la invasión celular, la acumulación de matriz, o la angiogénesis (Figura 8). Otra opción es la de bloquear los desencadenantes de la TEM como son la inflamación, la glucosa o diversos productos derivados de ésta, como los PDGs o los AGEs.

En este trabajo se relata el uso de varias moléculas empleadas con la intención de revertir o impedir el deterioro peritoneal causado por la diálisis peritoneal. Ya sea a través de la mediación directa de la TEM, o a través de la modulación del proceso inflamatorio.

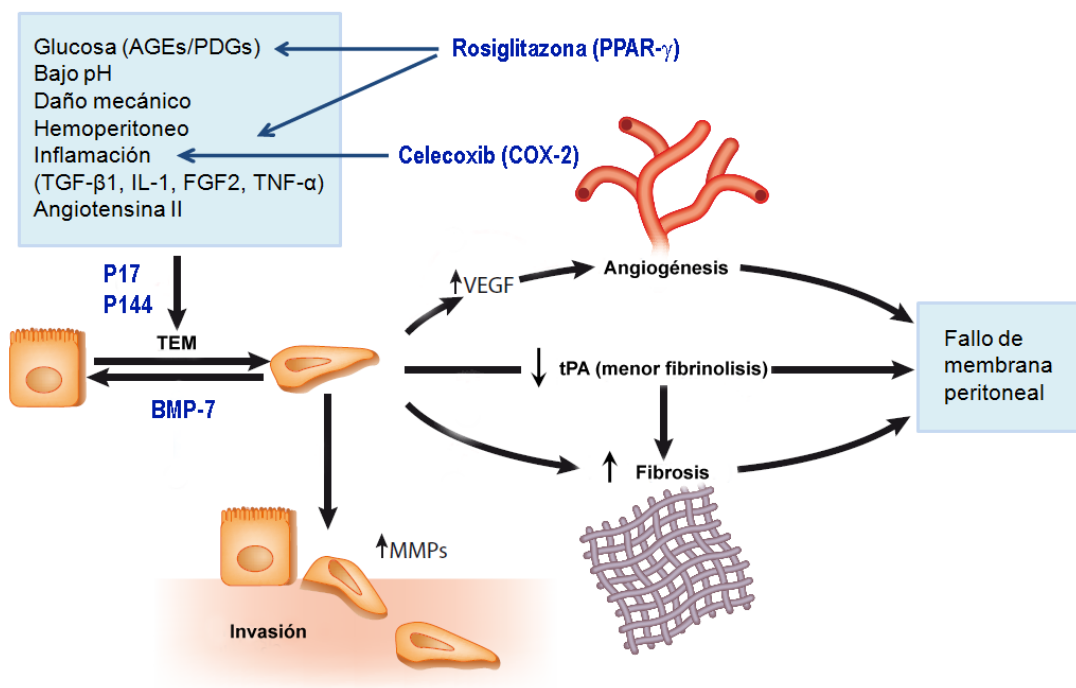


Figura 8. Dianas terapéuticas en el deterioro peritoneal

BMP-7

Como ya se ha comentado, la TEM es un proceso reversible ya que existen moléculas, como el BMP-7, que es capaz de regular de manera negativa la TEM, induciendo el proceso inverso, conocido como transición mesenquimo-epitelial (Liu, 2004). El BMP-7 es una proteína endógena, perteneciente a la superfamilia de TGF-β1 que previene y recupera la fibrosis en diversas enfermedades, afectando a órganos como el riñón, el hígado y el corazón

(Hruska *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Zeisberg *et al.*, 2003 y 2007; Attisano *et al.*, 2002). En estas enfermedades, el TGF- β 1 y el BMP-7 mantienen un delicado balance en el control de la TEM (Liu, 2004). El TGF- β 1 y el BMP-7 se unen a receptores específicos serina-treonina quinasa de tipo I (receptores ALK) y disparan distintas señales intracelulares mediadas por las proteínas Smad. Smad-2 y Smad-3 transducen la acción de TGF- β 1, mientras que Smad-1, Smad-5 y Smad-8 median la señalización de BMP-7. Otro miembro de esta familia es Smad-4, la cual es común a ambas rutas (Attisano *et al.*, 2002; Wrana, 2000; Massagué, 2000).

El papel de BMP-7 en el proceso del deterioro peritoneal no ha sido estudiado a fondo. Vargha y colaboradores demostraron que el BMP-7 es capaz de producir la reversión mesenquimo-epitelial de las células mesoteliales con fenotipo fibroblastoide, extraídas de los efluentes peritoneales de pacientes en diálisis peritoneal (Vargha *et al.*, 2006). En un trabajo reciente, se ha demostrado que el BMP-7 es capaz de prevenir y revertir la TEM de las células mesoteliales inducida por glucosa en un modelo *in vitro*, así como causar la disminución de la fibrosis peritoneal en ratas que habían sido previamente expuestas a un tratamiento de diálisis peritoneal (Yu *et al.*, 2009). Sin embargo, la habilidad de bloquear la TEM inducida por TGF- β 1 en células mesoteliales cultivadas *in vitro*, así como la capacidad del BMP-7 de impedir el deterioro peritoneal en un modelo *in vivo* de diálisis peritoneal no ha sido estudiada.

Inhibición de COX-2

Las ciclooxygenasas (COX) son las enzimas limitantes de la velocidad de síntesis de las prostaglandinas por la oxidación del ácido araquidónico (Turini *et al.*, 2002). Mientras que COX-1 esta constitutivamente expresada y se encuentra implicada en funciones de homeostasis, la expresión de COX-2 es inducible y esta implicada en un número de procesos patológicos, incluyendo inflamación, angiogénesis y crecimiento tumoral (Turini *et al.*, 2002; Gately *et al.*, 2004; Khanapure *et al.*, 2007). Con respecto al papel de COX-2 en fibrosis, se han descrito tanto funciones pro como anti-fibróticas (Bonner *et al.*, 2002;

Cheng *et al.*, 2002; Wilborn *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 2003), sin embargo se desconoce si COX-2 está implicado en el deterioro de la membrana peritoneal durante la diálisis peritoneal. Se sabe que las prostaglandinas son localmente producidas en la cavidad peritoneal de pacientes en diálisis peritoneal y que su síntesis se incrementa durante la peritonitis, resultando en un aumento de permeabilidad de la membrana peritoneal hacia las macromoléculas (Steinhauer *et al.*, 1986; Zemel *et al.*, 1993). Los mayores candidatos a producir prostaglandinas en este contexto, son los macrófagos y las células mesoteliales. Experimentos *in vitro* han demostrado que los monocitos expuestos a AGEs, responden con la producción de COX-2 y la secreción de prostaglandina E2 (Shanmugam *et al.*, 2003). También se sabe que las altas concentraciones de glucosa promueven la síntesis de PGE2 por parte de las células mesoteliales (Sitter *et al.*, 1998). Por todo ello, resulta atractivo especular con el estudio de la acción de inhibir COX-2 en el contexto de la diálisis peritoneal.

ROSIGLITAZONA

El receptor- γ del activador-proliferador del peroxisoma (PPAR- γ) es un miembro de los receptores de hormonas nucleares. Dicho receptor presenta un papel clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa y los lípidos (Rosen *et al.*, 2001). Los agonistas de PPAR- γ son capaces de reducir la glicemia mediante la mejora a la sensibilidad de la insulina, por ello son utilizados con el fin de tratar la diabetes de tipo II (Bensinger *et al.*, 2008; Yki-Jarvinen, 2004). El uso de los agonistas de PPAR- γ ha revelado que además poseen propiedades anti-inflamatorias, las cuales parecen estar relacionadas con la modulación de la respuesta inflamatoria innata y adaptativa, así como por su capacidad de activar las células T reguladoras (Ricote *et al.*, 1998; Castrillo *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2000; Daynes *et al.*, 2002; Hontecillas *et al.*, 2007; Wohlfert *et al.*, 2007). Además, los ligandos de PPAR- γ también han demostrado ser capaces de actuar como agentes antifibróticos en diversos modelos experimentales, incluyendo el fallo renal, ya sea asociado o no a la diabetes (Li *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2008; Toblli *et al.*, 2009;

Pistrosch *et al.*, 2005). También ha sido descrito que los agonistas de PPAR- γ son capaces de mejorar la función renal en pacientes con incipiente nefropatía diabética (Pistrosch *et al.*, 2005), sin embargo, el potencial protector de estas moléculas en el marco de la diálisis peritoneal apenas ha sido estudiado. Los únicos datos existentes al respecto, se realizaron con un modelo en rata de peritonitis encapsulante. El uso de la rosiglitazona, agonista de PPAR- γ , demostró ser capaz de disminuir los daños funcionales y estructurales causados en dichos modelos. Sin embargo, en estos trabajos no se estudio el mecanismo por el cual actuó la rosiglitazona. Del mismo modo, se desconoce el efecto del uso de los agonistas de PPAR- γ en el contexto de la exposición a líquido de diálisis. Es por ello que nos decidimos a responder estas cuestiones, mediante la realización de experimentos *in vitro* e *in vivo*, haciendo uso del agonista de PPAR- γ conocido como rosiglitazona.

Péptidos anti-TGF β 1 (P17 y P144)

El TGF- β 1 es la molécula que con mayor potencia es capaz de inducir la TEM en diversos tejidos y órganos (Border *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009; López-Novoa *et al.*, 2009). El TGF- β 1 es también una citoquina clave en la diferenciación miofibroblástica de los fibroblastos residentes y del reclutamiento de fibrocitos así como de la conversión mesenquimal de las células endoteliales a través transición endotelio-mesenquimal (TEnM) (Li *et al.*, 2009; Bellini *et al.*, 2007; Desmouliere *et al.*, 1993). TGF- β 1 se une al receptor específico de tipo I serina-treonina quinasa disparando las vías de señalización dependientes e independientes de Smad, resultando en una profunda reprogramación molecular, incluyendo la bajada de expresión de moléculas de adhesión celular como E-cadherina y el aumento de expresión de moléculas asociadas con el fenotipo mesenquimal como, Snail, fibronectina, colágeno I y α -SMA (Xu *et al.*, 2009; Aroeira *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2002). El TGF- β 1 es considerado la molécula clave en el desarrollo de la disfunción peritoneal, debido a que su sobre-expresión se correlaciona con los peores pronósticos en diálisis peritoneal (Lai *et al.*, 2000; 17, Gangji *et al.*, 2009; Yao

et al., 2008). La importancia del TGF- β 1 ha sido sugerida también por diversos estudios que hicieron uso de modelos animales, en los cuales el gen del TGF- β 1 se transdujo en la cavidad peritoneal a través de vectores de adenovirus. Las consecuencias inmediatas fueron los mismos daños observados en el peritoneo que tienen lugar en los pacientes en diálisis, incluyendo fibrosis y angiogénesis (Margettset *et al.*, 2001 y 2005). Que la simple sobre-expresión de esta citoquina, sea capaz de recapitular los cambios que ocurren en el peritoneo de pacientes en diálisis peritoneal puede ser indicativo de la importancia de ésta. La sobre-expresión de moléculas que contrarrestan la señalización de la vía de los Smads activados por TGF- β 1, incluyendo Smad-7 y BMP-7, es capaz de prevenir y revertir el deterioro peritoneal inducido por diálisis peritoneal (Liu, 2004; Guo *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). Además, la inhibición de las rutas inducidas por TGF- β 1 independientes de Smad disminuye el daño de la membrana peritoneal en diferentes modelos experimentales (Zhu *et al.*, 2010). Sin embargo, nadie ha explorado hasta ahora los efectos que tiene el bloqueo directo del TGF- β 1 en el contexto de la diálisis peritoneal.

En este estudio, empleamos dos péptidos sintéticos (P17 y P144) diseñados para unirse de manera directa al TGF- β 1 y así bloquear su función biológica. El efecto de estos péptidos ha demostrado actuar a nivel sistémico, y de poseer una gran capacidad anti-fibrótica en fibrosis de hígado, corazón y piel (Dotor *et al.*, 2007; Ezquerro *et al.*, 2003; Hermida *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2005).

4. OBJETIVOS

- Desarrollo de un modelo de ratón de exposición a líquido de diálisis.
- Testar la transición epitelio-mesenquimal (TEM) de las células mesoteliales como diana terapéutica.
- Comprobar el efecto de las distintas soluciones de diálisis sobre la TEM de las células mesoteliales.
- Comprobar el efecto de las distintas soluciones de diálisis sobre el daño peritoneal en un modelo de ratón de diálisis peritoneal.
- Conocer el papel de BMP-7 en la TEM de las células mesoteliales.
- Estudiar el balance BMP-7/TGF- β 1 en la TEM de las células mesoteliales.
- Comprobar el efecto terapéutico del tratamiento con BMP-7, sobre un modelo en rata de diálisis peritoneal.
- Conocer la implicación de COX-2 en el desarrollo del daño ocasionado por la diálisis peritoneal.
- Testar el efecto de la inhibición de COX-2 en la TEM de las células mesoteliales.
- Comprobar el efecto y mecanismos, del agonista de PPAR- γ conocido como rosiglitazona, sobre la diálisis peritoneal, en un modelo de ratón.
- Testar el efecto de la rosiglitazona sobre la TEM de las células mesoteliales.

- Estudiar el origen y diversidad de los fibroblastos formados como consecuencia del tratamiento de la diálisis peritoneal, en un modelo de ratón.
- Estudiar el efecto del bloqueo de TGF- β 1 en un modelo de ratón de diálisis peritoneal.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Células

Las células mesoteliales extraídas de los efluentes, fueron obtenidas mediante centrifugación del líquido de diálisis desechado por pacientes, que efectuaron intercambios nocturnos, con una solución de glucosa 2.27% y con 1.25-1.75 mmol de calcio por litro. Transcurridos 15-30 días, los cultivos alcanzaron la confluencia. El fenotipo de estas células permanece estable durante al menos dos o tres pases.

Las células mesoteliales procedentes de epiplón fueron obtenidas mediante la digestión enzimática de éste, obtenido de pacientes no urémicos, no sometidos a diálisis peritoneal. La extracción se produce durante la realización de cirugía no relacionada con ninguno de los factores comentados. Las muestras se digieren con 0.05% de tripsina y 0.02% de EDTS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos).

Todas las células fueron cultivadas en medio M199 de Earle, con 20% de suero bovino fetal, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, y 2% de Biogro-2 (contiene insulina, transferrina, etanolamina y putrescina) (Biological Industries, Beth Haemek, Israel). Para la realización de los experimentos, las células fueron cultivadas en pocillos recubiertos de colágeno I (50 µg/ml; PureCol, Inamed Biomaterials, Fremont, CA, Estados Unidos) y sin Biogro-2. TGF-β1 e IL-1β (RD Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos) fueron utilizados en concentraciones que se encuentran dentro del rango observado en los efluentes de pacientes en diálisis peritoneal con peritonitis (Sakamoto *et al.*, 2005).

Este estudio se ajusta a la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, España). Se obtuvo consentimiento escrito, de los pacientes en diálisis peritoneal, para la utilización de los efluentes. Los donantes de epiplón, dieron su consentimiento oral.

Para inducir TEM *in vitro* se trataron las células con TGF-β1 (e IL-1β en los casos indicados) o con efluente de pacientes en diálisis que sufrían peritonitis, diluido ½ con medio de cultivo. Varios estudios relatan estos estímulos como buenos inductores de TEM en condiciones *in vitro* (Yañez-Mo *et al.*, 2003; Liu, 2004; Aroeira *et al.*, 2009). En estos experimentos *in vitro* también se hizo uso de rhBMP-7 (Prospec, Rehovot, Israel), el inhibidor de COX-2 NS398 (Alexis

Biochemicals, San Diego, CA), el agonista de PPAR- γ rosiglitazona (GlaxoSmithKline, Brentford, Middlesex, Reino Unido), y los péptidos inhibidores de TGF- β 1 P17 y P144 (Digna Biotech, Pamplona, España).

En otros experimentos, las células mesoteliales fueron cultivadas en medio de cultivo mezclado, a partes iguales, con líquido de diálisis de diferentes composiciones (Stay Safe, Fresenius Medical Care; Balance, Fresenius Medical Care).

La pureza de los cultivos de células mesoteliales fue determinado por el análisis de expresión de marcadores mesoteliales: ICAM-1, citoqueratinas y calretinina.

5.1.1. “Cierre de herida” (wound healing):

Se utilizaron células mesoteliales, extraídas de epiplón, tratadas o no con diferentes estímulos. Cuando los cultivos alcanzaban la confluencia, se sometieron a un daño mecánico, utilizando un “scraper”, realizando un hueco en el cultivo de aproximadamente 150 μ m. Los cultivos fueron fotografiados en esa zona cada 12 horas durante dos días.

5.1.2 Ciclo celular y apoptosis:

Para analizar el ciclo celular se cultivaron las células mesoteliales, procedentes de epiplón, en la presencia o ausencia de 20 % de suero de bovino fetal y expuestas a diferentes dosis de rosiglitazona (0, 1, 10 y 100 mM) durante 48 horas. Las células fueron recogidas y fijadas con 70% de etanol frío, durante 30 minutos. Después del lavado, las muestras fueron resuspendidas en PBS, diluido a partes iguales con una solución conteniendo 200 mg/ml de RNasa (Sigma-Aldrich), 20 mg/ml de ioduro de propidio (Sigma-Aldrich), y 0.1 % de Triton X-100. La suspensión celular se mantuvo en estas condiciones durante 30 minutos. A continuación se midió el contenido de ADN a través de un clitómetro de flujo FACS Calibur (BD Bioscience).

Para analizar el efecto de la rosiglitazona sobre la apoptosis, las células mesoteliales fueron cultivadas hasta la sub-confluencia, y cultivadas en un medio de cultivo libre de suero, durante 24 horas. Las células fueron pre-incubadas con rosiglitazona (0.1, 1, and 10mM) o placebo (DMSO) durante 1 hora y tratados posteriormente con 100nM de estaurosporina durante 24 horas. En otros experimentos, las células fueron pre-tratadas con rosiglitazona o placebo durante 1 hora y entonces cultivadas durante 72 horas, con una mezcla, a partes iguales, entre medio de cultivo y líquido de diálisis (4.25% de glucosa, altos contenidos de PDGs, stay safe; Fresenius medical care) o medio libre de suero RPMI 164. Para cuantificar la muerte celular, las células despegadas fueron recogidas tras una tripsinización suave. La apoptosis fue cuantificada midiendo el contenido de ADN mediante citometría de flujo, usando el programa Cellquest (BD Biosciences).

5.2. Western Blot

Las células mesoteliales fueron lisadas en tampon (1% dosicolato de sodio, 0.1% dodecil sulfato de sodio) y el extracto proteico total fue cuantificada usando un kit de medida de proteína (Pierce, Cambridge, MA, Estados Unidos). 50 µg de las proteínas de las células mesoteliales fueron resuspendidas en geles 8–10% dodecil sulfato de sodio –poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, que fueron bloqueadas con leche desnatada, y posteriormente incubadas con anticuerpos específicos anti E-cadherina, colágeno I, α -SMA, Smad-1, 5 y 8, fibronectina, tubulina (Abcam Inc, Cambridge, Reino Unido), p-Smad-1, 5 y 8, Smad-2, p-Smad-2, Smad-3, p-Smad-3, COX-2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Estados Unidos), BMP-7 (Santa Cruz biotechnology CA, Estados Unidos) y β -actina (Becton & Dickinson, Frankling Lakes, NJ, Estados Unidos). Las membranas fueron incubadas con anticuerpo realizado en cabra, anti-ratón IgG, conjugado con peroxidasa (Pharmigen, San Diego, CA, Estados Unidos) y revelado con un kit de detección de quimioluminiscencia (ECL; Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania). Las imágenes fueron obtenidas con el equipo LAS-1000, acoplado a una cámara (Fujifilm, Cedex, Francia).

5.3. Citometría de flujo

El análisis de las células obtenidas de los efluentes de los ratones, fue llevado a cabo mediante el uso del citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Las suspensiones celulares obtenidas fueron secuencialmente filtradas a través de filtros con tamaño de poro de 70 μm (BD Falcon) y 40 μm (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Se emplearon los anticuerpos monoclonales: anti-CD4 (L3T4), anti-CD8 (Ly-2), anti-CD3, anti-CD19 y anti CD-25 (BD Biosciences), anti- F4/80 (e-Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) y anti CD11b (Becton & Dickinson, Frankling Lakes, NJ, Estados Unidos). El marcaje intracelular del factor de transcripción Foxp3, mediante el uso de un anticuerpo anti-Foxp3, fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante (FJK-16s; e-Bioscience). Como control se utilizaron anticuerpos irrelevantes con el mismo isotipo. Un posterior análisis fue llevado a cabo con el programa FACS Diva (BD Biosciences).

5.4. RT-PCR cuantitativa

5.4.1. Muestras celulares

Para el análisis mediante RT-PCR cuantitativa, las células mesoteliales fueron lisadas en TRI Reagent (Ambion, Inc, Austin, TX, Estaods Unidos), y el RNA fue extraído siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA complementario fue sintetizado a partir de 2 μg del total de RNA, mediante transcripción inversa (RNA PCR Core Kit, Applied Biosystems Inc, New Jersey, Estados Unidos). La PCR en tiempo real fue llevada a cabo en un Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), usando el kit SYBR verde (Roche Diagnostics GmbH) y cebadores específicos (tabla 4).

5.4.2. Tejidos de ratón

Se analizaron mediante RT-PCR los niveles de diversos marcadores mesenquimales. Muestras de tejido del peritoneo parietal fueron congeladas, y homogeneizadas mecánicamente, para la posterior extracción de RNA en el medio TRI reagent usando un homogenizador Polytron.

El DNA complementario ha sido sintetizado a partir de 2 µg de RNA mediante transcripción inversa. La PCR a tiempo real fue llevada a cabo en un Light Cycler 480 usando un SYBR Green Kit (Roche Diagnostics GmbH) y haciendo uso de cebadores específicos (tabla 4).

Gen	Secuencia de cebadores RT-PCR	
	Cebador delante	Cebador reverso
E-Cadherina humana Tm= 62°C	5'TGAAGGTGACAGAGCCTCTG 3'	5'TGGGTGAATTCGGGCTTGTT 3'
Fibronectina humana Tm= 66°C	5' CCTGAAGCTGAAGAGACTTGC 3'	5' CGTTTCTCCGACCACATAGGA 3'
Colágeno I humana Tm= 64°C	5' GCTATGATGAGAAATCAACCG 3'	5' GCTTCCCCATCATCTCCATTC 3'
Snail-1 humano Tm= 55°C	5'GCAAATACTGCAACAAGG 3'	5'GCACTGGTACTTCTTGACA 3'
H3 humano Tm= 62°C	5'AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG 3'	5'ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC 3'
COX-2 humano Tm= 56°C	5'TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT3'	5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT 3'
Fibronectina ratón Tm= 63°C	5'GCAAACCTATAGCTGAGAAGTG 3'	5'CAAGTACAGTCCACCATCATC 3'
α-SMA ratón Tm= 54°C	5' CAGTCGCTGTGAGGAACC 3'	5' GTGCTGTCTTCTCTTCACAC 3'
Colágeno I ratón Tm= 63°C	5' TGCCGCGACCTCAAGATGTG 3'	5' CACAAGGGTGCTGTAGGTGA 3'
18S ratón Tm= 60°C	5' GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG 3'	5' CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG 3'

Tabla 4. Secuencia de cebadores utilizados para RT-PCR.

5.5. Modelos murinos de diálisis peritoneal

5.5.1. Ratas

Se utilizaron ratas Wistar (Harlan CPB, Horst, Holanda) que pesaban entre 250 y 275 g al comienzo del experimento. El experimento fue aprobado por el comité ético de la "Vrije Universiteit" de Amsterdam (Holanda). Durante el experimento, se administró comida y agua *ad libitum* a los animales.

5.5.2. Ratones

Los ratones utilizados pertenecen a la cepa C57BL/6, y son hembras de entre 12 y 16 semanas de edad (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, España). El protocolo experimental siguió la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de los institutos nacionales y fue aprobado por el comité ético de la

Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz. Durante los experimentos, se administró comida y agua *ad libitum* a los animales.

5.5.3. Cirugía y tratamiento

Se utilizó un catéter realizado a medida, unido a una bomba de acceso de silicona, con un núcleo de aluminio (figura 7) (Access Technologies, Skokie, IL, Estados Unidos). Se implanto subcutáneamente, siendo el fin del catéter introducido en la cavidad peritoneal mediante cirugía. Durante la semana de recuperación, los animales recibieron diariamente, a través del catéter implantado, 0.2 (ratones) o 2 (ratas) ml de salino con 1 u/ml de heparina. Pasado este período los animales comenzaron el tratamiento dispuesto en cada caso (tabla 5).

En el último día, los animales fueron sometidos a un test de intercambio peritoneal (PET test), utilizando en todos ellos una solución estándar de líquido de diálisis (4.25% de glucosa, altas concentraciones de PDGs; Stay Safe, Fresenius medical care). Transcurrido un tiempo, con el animal sedado, se abrió, mediante incisión, el peritoneo del animal y se recogió el total del efluente peritoneal. Este será utilizado para contabilizar la ultrafiltración (volumen recogido), medir la cantidad de citoquinas así como contabilizar y clasificar los diversos tipos celulares presentes en él. Posteriormente se procede a la toma de muestras de tejido de peritoneo parietal, siendo extraídas del contralateral al lugar de inserción del catéter. Las muestras se fijan en formalina o líquido de bouin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), inclusión en OCT y congelación y/o congelación directa. Las primeras se incluyen en parafina, y junto con las incluidas en OCT, serán cortadas en secciones para su posterior análisis. Las muestras congeladas servirán para extraer RNA. En ratas también se tomaron “huellas de hígado” (“liver imprints”). Estas se toman utilizando portaobjetos recubiertos con un 3% de gelatina (Whitaker *et al.*, 1980). Los portaobjetos fueron presionados contra la superficie del hígado y retirados con la intención de recoger la monocapa de células mesoteliales presentes en el hígado.

Experimento	Grupo	Animal	Catéter	Tratamiento	Líquido	Número	Tiempo
BMP-7	Control	Rata wistar	No	No	No	8	5 semanas
	PDF	Rata wistar	Si	No	Dianeal PD4 3.86% glucosa pH=5.2	8	5 semanas
	PDF + BMP-7	Rata wistar	Si	rhBMP-7 0.25 mg/Kg/día Diluido	Dianeal PD4 3.86% glucosa pH=5.2	10	5 semanas
Inhibición de COX-2	PDF	Ratón C57BL/6	Si	No	Stay Safe 4.25% glucosa	20	5 semanas
	PDF + Cel	Ratón	Si	Celecoxib 2 µg/g/día Vía oral	Stay Safe 4.25% glucosa	20	5 semanas
	Salino	C57BL/6	Si	No	Salino	15	5 semanas
	Salino + Cel	Ratón	Si	Celecoxib 2 µg/g/día Vía oral	Salino	15	5 semanas
	PDF	C57BL/6	Si	No	Stay Safe 4.25% glucosa	10	15 días
	PDF + Cel	Ratón	Si	Celecoxib 2 µg/g/día Vía oral	Stay Safe 4.25% glucosa	10	15 días
	Altos PDGs	C57BL/6	Si	No	Stay Safe 4.25% glucosa	5	7 días
	Altos PDGs	Ratón	Si	No	Stay Safe 4.25% glucosa	6	35 días
	Bajos PDGs	C57BL/6	Si	No	Bicavera 4.25%	5	7 días
	Bajos PDGs	Ratón	Si	No	Bicavera 4.25%	6	35 días
Rosiglitazona	Control	C57BL/6	No	No	No	5	3 semanas
	Salino	Ratón	Si	No	Salino	7	3 semanas
	PDF	C57BL/6	Si	No	Stay Safe 4.25% glucosa	12	3 semanas
	PDF + RSG	Ratón	Si	20 mg/Kg/día Vía oral	Stay Safe 4.25% glucosa	11	3 semanas
Péptidos anti-TGF-β1 (P17 y P144)	Control	C57BL/6	Si	No	Salino	7	5 semanas
	PDF	Ratón	Si	Péptido control 4 mg/Kg/día Diluido	Stay Safe	10	5 semanas
	PDF + P17	C57BL/6	Si	P17 4 mg/Kg/día Diluido	4.25% glucosa	11	5 semanas
	PDF + P144	Ratón	Si	P144 4 mg/Kg/día Diluido	Stay Safe	11	5 semanas

Tabla 5. Resumen de los experimentos realizados en modelos murinos de exposición a líquido de diálisis, para la realización de este estudio.

5.6. Análisis histológico

Las huellas de hígado (“liver imprints”) fueron teñidos con solución de May Grunwald Giemsa. La morfología celular fue observada mediante microscopía óptica y haciendo uso de un ocular con una cuadrícula. El número de células por 0.1mm² de área fue contado y la media de 16 de estas (observadas a un aumento de 400 x) fue calculada para cada portaobjeto, y expresado como células por milímetro cuadrado.

Las muestras incluidas en parafina fueron cortadas en secciones de 3-5 µm, desparafinadas y teñidas con hematosilina-eosina, Van Gieson, o con tricrómico de Masson (Merck, Darmstadt, Alemania). El grosor del tejido submesotelial fue determinado mediante una medición ciega utilizando un ocular métrico, y se expresa como el promedio de 10 medidas independientes de la membrana peritoneal de cada animal. Antes de la inmunohistoquímica, las secciones de tejido, fueron calentadas sumergidas en *Real Target Retrieval Solution*, que contiene tampón citrato de pH 6.0 (Dako, Glostrup, Dinamarca), con el fin de desenmascarar los antígenos. Las muestras fueron pre-tratadas con *Real Peroxidase-Blocking Solution* (Dako, Glostrup, Dinamarca), para bloquear la actividad de la peroxidasa del tejido. El sistema de detección Dako REAL EnVision Detection System, Conejo/ratón (Dako, Glostrup, Dinamarca), fue empleado para detectar los siguientes anticuerpos primarios monoclonales realizados en ratón; anti- α -SMA (clone 1A4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos); anti-pan-citoqueratina (clone PCK-26; Sigma- Aldrich); anti-CD31 (clone JC70A; Dako); y anti-AGEs (clone 6D12; Cosmo Bio, Tokyo, Japan). En todos los casos, los anticuerpos primarios fueron incubados durante 1 hora, a temperatura ambiente, en una cámara húmeda, habiendo bloqueado con anterioridad la unión no específica del anticuerpo secundario mediante un pre-tratamiento de 15 minutos con suero de cabra. Un anticuerpo biotinilado realizado en conejo, anti-rata IgG (HpL), fue utilizado para detectar el anticuerpo monoclonal anti-CD45 anti-ratón, realizado en rata (clone 30-F11; BD Biosciences). Este complejo fue visualizado usando el kit RTU Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos), habiendo bloqueado la union no específica mediante un pretratamiento de 15 minutos

con suero de conejo. Para la realización de una inmunohistoquímica doble, se utilizó el En- Vision G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse DABp/ Permanent Red (Dako) fue empleado para detectar α -SMA (marrón) y citoqueratinas (rojo) de manera simultánea. Todas las secciones fueron contrateñidas con hematosilina.

Las células CD31⁺, CD45⁺ y los AGEs de 10 campos de visión de cada muestra fueron cuantificados usando el programa Image-J 1.37c (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

Secciones de 5 μ m de grosor de tejido congelado fueron teñidas para su análisis mediante inmunofluorescencia. Se utilizaron anticuerpos para visualizar la vasculatura (CD31; Serotec, Oxford, Reino Unido), los macrófagos activados (ED2; Serotec, Oxford, Reino Unido), las células mesoteliales (Pan-Citoqueratina; Sigma-Aldrich), células derivadas de la médula ósea (CD45; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) y fibroblastos patológicos (FSP-1; Dako o α -SMA; Abcam Inc, Cambridge, UK). Las secciones congeladas fueron fijadas durante 15 minutos en 4% de formaldehído en PBS. Se bloqueó durante 60 minutos con una solución de PBS con 0.3% de triton X-100 y el 10% de suero de caballo. Los anticuerpos primarios fueron incubados en PBS con 0.1% de triton X-100 toda la noche a 4°C. Después de 3 pasos de lavado, anticuerpos secundarios, marcados con fluoróforos Alexa, fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras otra fase de lavados, las preparaciones fueron montadas con 4,6-diamidino-2-fenylindole (DAPI), como marcador nuclear (Vectashield; Vector Laboratories). Como control negativo de la inmunofluorescencia, se hizo uso de anticuerpos irrelevantes (10% suero de conejo) en lugar del anticuerpo primario. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa informático image analysis (AnalySIS, Sof Imaging System). El número de células con marcaje sencillo o doble fue contado y se expresa como el promedio de 10 medidas independientes del tejido de cada animal.

5.7.ELISA

Para la determinación de los niveles de citoquinas se sembraron 10^5 células por pocillo, en placas de 24 pocillos. Se cultivaron hasta la confluencia, entonces se incubaron bajo diferentes condiciones y tras ello se recogieron los sobrenadantes. A continuación, se determinaron en los sobrenadantes, las concentraciones de las citoquinas, siguiendo las instrucciones del fabricante: TGF- β 1, VEGF y PGE₂ (R&D Systems Inc); fibronectina (Biomedical Technologies, Stoughton, MA). La expresión de BMP-7 fue medida utilizando el protocolo descrito por Merrihew y colaboradores (2003), usando dos anticuerpos ant-BMP-7 (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan; Santa Cruz Biotechnology CA, USA).

Las cantidades de IL-10 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), VEGF y TGF- β 1 en el efluente peritoneal de ratón fueron determinadas siguiendo las instrucciones de los fabricantes (PeproTech; Rocky Hill, USA; Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA). En el efluente peritoneal de las ratas, se midió el ácido hialurónico mediante un ensayo de ELISA descrito por Fosang y colaboradores (1990).

5.8. Péptidos anti-TGF- β 1

P17 es un pequeño péptido de 15 aminoácidos (KRIWFIPRSSWYERA). Fue identificado dentro de una librería de péptidos expresada por fagos, y seleccionado debido a su capacidad para unirse a TGF- β 1. Ha demostrado poseer una fuerte capacidad de bloqueo de los efectos de TGF- β 1 tanto *in vitro* como *in vivo* (107, 108). El P144 es un péptido sintético de 14 aminoácidos (SVSRARPRLLLLGL) diseñado a partir de la proteína NS5B del genotipo 2a del virus de la hepatitis C (amino ácidos 3005-3018). Como control hemos empleado un péptido sintético irrelevante de 14 amino ácidos (SVSRARPRLLLLGL) diseñado también a partir de la proteína NS5B del genotipo 2a del virus de la hepatitis C (amino ácidos 3005-3018). Todos los péptidos (P17, P144 y péptido control) fueron sintetizados por los el método

Fmoc en fase sólida (Pecoits-Filho *et al.*, 2002; Zweers *et al.*, 1999). La pureza de los péptidos fue siempre mayor al 95%, testado por HPLC.

5.9. Sobre-expresión de TGF- β 1 en el peritoneo mediado por adenovirus

Ocho ratones hembra C57BL/6 (12-16 semanas de edad) fueron utilizadas en el experimento (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, España). El protocolo experimental siguió las directrices de la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de los institutos nacionales de salud y fue aprobado por el comité ético de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de la Paz. Los animales tuvieron acceso libre a agua y comida durante todo el experimento. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 100 μ L de suspensión que contenía 1×10^8 de ufp de adenovirus que expresa la forma activa de TGF- β 1 (n=5) o 1×10^8 ufp del mismo vector adenovírico vacío, que sirve como control (n=3). Cuatro días después de la inyección, los animales fueron anestesiados con isoflurano (MTC Pharmaceuticals) y sacrificados. El peritoneo parietal de los animales fue recolectado para su posterior análisis histológico mediante inmunofluorescencia.

5.10. Análisis estadístico

Los datos de los grupos fueron comparados mediante el test desapareado de la "t" de Student o el análisis factorial de la varianza (ANOVA) o el test de suma de rangos de Mann-Whitney, según el caso. Para la correlación lineal se usó el test de regresión de Spearman. Se utilizaron los programas SPSS statistic package version 14.5 (Chicago, IL) y GraphPad Prism version 4.0 (La Jolla, CA) para el análisis de los datos. Se consideró que había diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. BMP-7

6.1.1. BMP-7 esta constitutivamente expresado en las células mesoteliales y se reprime durante la TEM

El BMP-7 posee una función moduladora en la conversión mesenquimal de un amplio espectro de células epiteliales, por ello se estudió la expresión de BMP-7 en las células mesoteliales así como su papel en la TEM, un proceso clave en la disfunción de la membrana peritoneal (Aroeira *et al.*, 2007).

Las células mesoteliales extraídas de epiplón muestran expresión citoplásmica de BMP-7 como revela la tinción con anticuerpo anti-BMP-7 que aparece en el panel a de la figura 9 A. El tratamiento de estas células con 1ng/ml de TGF- β 1 durante 48 horas es capaz de inducir la TEM, lo cual desencadena una bajada en la expresión de BMP-7, como se aprecia en la imagen de inmunofluorescencia del panel b de la figura 9 A. De modo similar, estudiamos el patrón de expresión de BMP-7 *ex vivo*, en células mesoteliales extraídas de efluentes de pacientes en diálisis peritoneal. Seleccionamos éstas por su morfología clasificándolas como epitelioides o no-epitelioides. Las primeras se refieren a células que no han sufrido TEM y las segundas lo han hecho o ya han iniciado el proceso. El análisis mediante inmunofluorescencia revela que las células con fenotipo epitelioides muestran expresión de BMP-7 (figura 9 A, panel c), mientras que aquellas que poseen fenotipo no-epitelioides, muestran una tenue, y a veces nula, expresión de BMP-7 (figura 9 A, panel d). La disminución de BMP-7 durante la TEM tanto *in vitro* como *ex vivo* resulta significativa en ambos casos (figura 9 A, gráficas de la derecha). También se analizaron los niveles de expresión de BMP-7 a través de western blot. En este caso, los resultados también indican una disminución de la expresión de BMP-7, en las células que han sido tratadas con TGF- β 1 (figura 9 B). Estos datos fueron confirmados de un modo cuantitativo, mediante la medición de BMP-7 a través de la técnica de ELISA. Las muestras tomadas se corresponden con los extractos celulares, tanto en las células obtenidas de epiplón y sometidas a TEM mediante TGF- β 1, como en aquellas extraídas de los efluentes de los pacientes (figura 9 C).

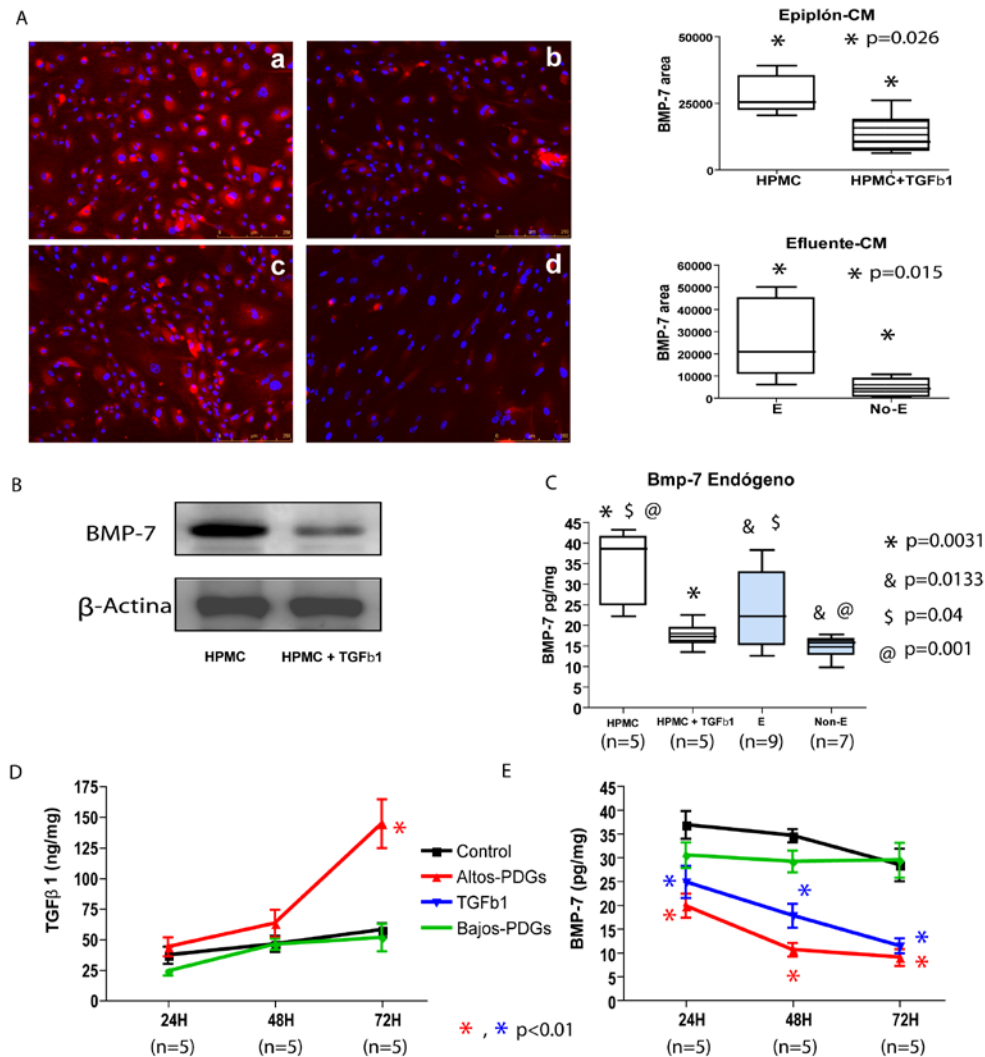


Figura 9. Caída de expresión de BMP-7 durante la TEM de las células mesoteliales (A). La microscopía de inmunofluorescencia muestra tinción citoplásmica de BMP-7 en células mesoteliales derivadas de epiplón (omento-CM; panel a). La exposición a 1 ng/mL de TGF-β1 durante 48 horas causa la bajada de expresión de BMP-7 (panel b). Células mesoteliales, extraídas del efluente, con fenotipo epitelioides, muestran tinción de BMP-7 (panel c) y aquellas que poseen fenotipo no-epitelioides, muestran una tenue tinción de BMP-7 (panel d). Aumento 400 x. La disminución de BMP-7 durante la TEM *in vitro* e *in vivo* es significativa en ambos casos, lo cual ha sido determinado mediante la cuantificación del área positiva de tinción de BMP-7 (gráfico de la derecha). (B) Análisis de la expresión de BMP-7 mediante western blot, en células mesoteliales extraídas de epiplón, tratadas o no con TGF-β1 durante 48 horas. (C) Análisis de la expresión de BMP-7 mediante ELISA en: células mesoteliales extraídas de epiplón (n=5), tratadas con TGF-β1 (n=5), células mesoteliales epitelioides de efluente (n=9) y células mesoteliales no-epitelioides de efluente (n=7). Se observa una disminución significativa durante el proceso de la TEM tanto *in vitro* como *in vivo*. (D, E) Las células mesoteliales derivadas de epiplón fueron incubadas durante 24, 48 o 72 horas con medio control, líquido de diálisis estándar (conteniendo altas concentraciones de PDGs; Altos PDGs) o una solución de diálisis conteniendo bajas concentraciones de PDGs (Bajos PDGs), diluidos 1/2 en medio de cultivo. Las células fueron tratadas también con TGF-β1 recombinante (1ng/ml). La síntesis de TGF-β1 secretada al medio de cultivo, fue medida mediante ELISA. Los resultados se muestran como nanogramos por miligramo del total de la proteína celular (D). La expresión de BMP-7 fue medida en los lisados celulares, mediante ELISA. Los resultados se muestran como picogramos por miligramo del total de la proteína celular (E). El experimento fue repetido 5 veces, los resultados se presentan como media ± desviación estándar. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, mediana, mínimo y máximo. Los símbolos indican diferencias estadísticas entre grupos.

Por último, quisimos conocer el efecto que presentan los distintos tipos de líquido de diálisis, sobre las células mesoteliales en condiciones *in vitro*. Para ello utilizamos células mesoteliales extraídas de epiplón y las cultivamos en un medio constituido en su 50% por líquido de diálisis. Se emplearon dos tipos de

líquidos, uno de composición estándar (con alto contenido en PDGs) y otro con propiedades más biocompatibles (con bajo contenido en PDGs). Los resultados muestran como se dispara la TEM en los cultivos expuestos al líquido estándar a 24 y 72 horas, resultando en una disminución significativa de la expresión de BMP-7, producida en cada uno de los distintos tiempos del experimento (Altos-GDPs vs Control, $p = 0.0099$ a 24 h; $p = 0.0074$ a 48 h, $p = 0.0081$ a 72 h). También se observó una inducción de expresión significativa de TGF- β 1 a 72 horas (Altos-PDGs vs Control, $p = 0.0077$) (Figuras 9 D y E). En contraste, cuando las células mesoteliales fueron incubadas con líquidos de diálisis más biocompatibles, se observó una ligera incidencia sobre el proceso de TEM. En este caso, las células no pierden la expresión de BMP-7, ni tampoco se induce la producción de TGF- β 1 (Figura 9 D y E).

También se analizaron los niveles de expresión de la ruta de las proteínas Smad, implicadas en la señalización de BMP-7 y TGF- β 1. Las células mesoteliales extraídas de epiplón muestran una activación (fosforilación) basal de las proteínas Smad1/5/8, específicas de la señalización por la vía de BMP-7 (figura 10 A). Se puede observar que la exposición a 1ng/ml de TGF- β 1, durante 24 o 48 horas, ocasiona una disminución de la fosforilación de Smad 1/5/8 y provoca la fosforilación de Smad 2/3, proteínas específicas de la ruta de TGF- β 1. Además, las células mesoteliales no tratadas, muestran inmunotinción de las formas activadas de Smad 1/5/8 (figura 10 B, izquierda), que decrecen tras el tratamiento con TGF- β 1 (figura 10 B, medio). Interesantemente, el co-tratamiento de las células mesoteliales con TGF- β 1 (1 ng/ml) y BMP-7 recombinante humano (rhMNP-7; 0.5 ug/ml) es capaz de restablecer la activación de Smad 1/5/8 (figura 10 B, derecha). Estos resultados indican que la acción del TGF- β 1, sobre la bajada de activación de Smad 1/5/8, puede ser causada por la caída de expresión de BMP-7. Esta conclusión proviene del hecho de que la adicción exógena de BMP-7, es capaz de prevenir el efecto ejercido por TGF- β 1.

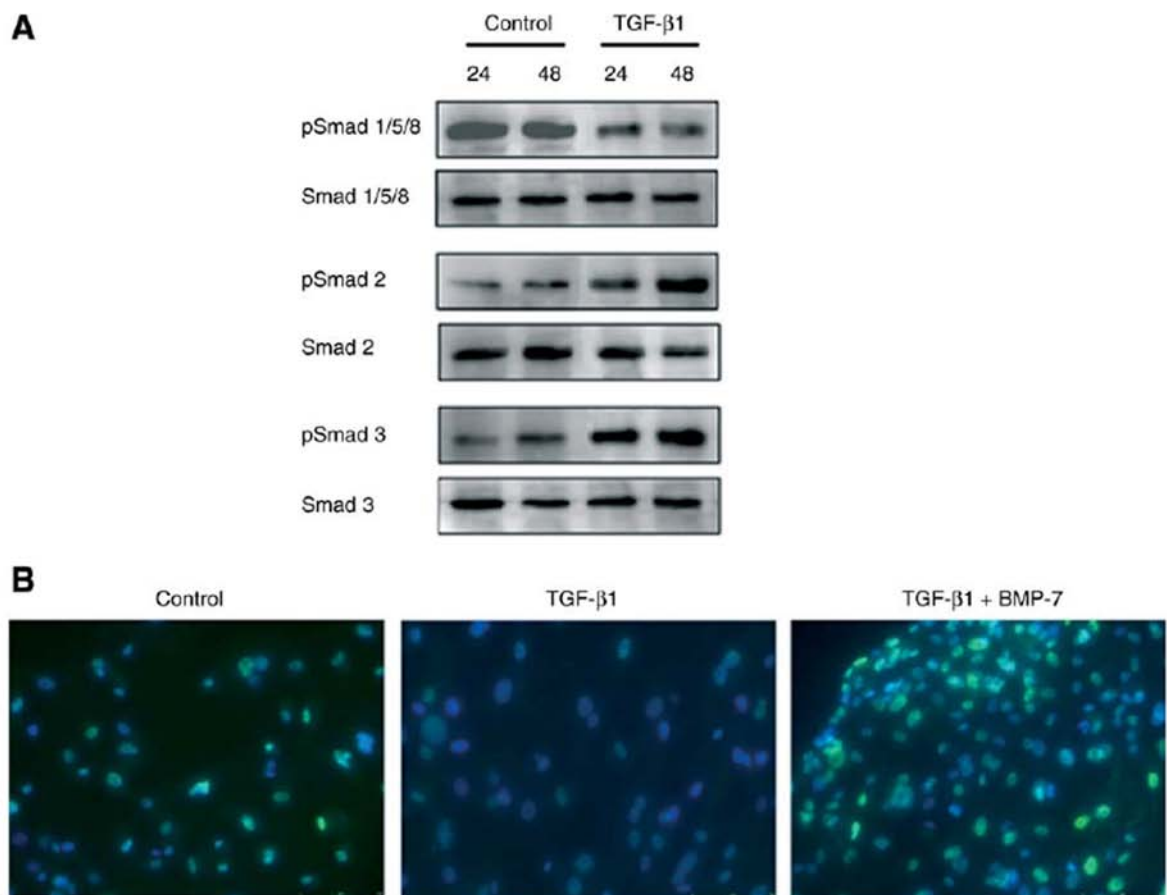


Figura 10. Inactivación de las proteínas Smad específicas de BMP-7 durante la TEM de las células mesoteliales. (A). Células mesoteliales extraídas de omento fueron tratadas o no con 1 ng/mL de TGF-β1 durante 24 o 48 horas. El análisis mediante western blot muestra activación basal (fosforilación) de las proteínas Smad 1, 5 y 8, específicas de BMP-7. Su fosforilación decrece debido al tratamiento con TGF-β1. En contraste, la exposición a TGF-β1 resulta en un aumento de la fosforilación de Smad 2 y 3. (B). Mediante inmunofluorescencia se observa tinción nuclear de la forma activa de Smad 1, 5 y 8 en las células mesoteliales sin tratar (izquierda), que decrece con la exposición a TGF-β1 al cabo de 48 horas (medio). El co-tratamiento de las células mesoteliales con TGF-β1 y BMP-7 (0.5 µg/ml) restablece la activación y la translocación celular de las proteínas Smads específicas de BMP-7 (derecha). El experimento fue repetido al menos tres veces, mostrando un experimento representativo. Aumento 630 x.

6.1.2. BMP-7 contrarresta la TEM inducida por TGF-β1

Como se mostró en el apartado anterior, la adicción exógena de BMP-7 es capaz de prevenir la inactivación de Smad 1/5/8 causada por TGF-β1. Es por ello que investigamos el papel de BMP-7 en el mantenimiento del fenotipo mesotelial de las células mesoteliales. Con este fin, analizamos si añadir rhBMP-7 puede recuperar el fenotipo epitelial perdido tras la exposición a TGF-β1. El tratamiento con TGF-β1 (1ng/ml) durante 48 horas, de células mesoteliales extraídas de epiplón, resultó en un cambio morfológico hacia un fenotipo fibroblástico, acompañado de una bajada de expresión de E-cadherina. En aquellos cultivos también tratados con rhBMP-7 (0.5 mg/ml), se

logro impedir el cambio fenotípico, así como la pérdida de E-cadherina (figura 11 A y B). Además, la adicción de rhBMP-7 (0.5mg/ml) fue capaz de impedir el aumento de expresión de marcadores mesenquimales, como colágeno I, α -SMA o VEGF. Estos, se encuentran sobre-expresados cuando las células mesoteliales son tratadas solamente con TGF- β 1 (figura 11 C y F). Los resultados demuestran que el BMP-7 presenta un papel en el mantenimiento del fenotipo mesotelial de las células mesoteliales y que es capaz de prevenir la conversión mesenquimal de estas células, causada por la exposición a TGF- β 1.

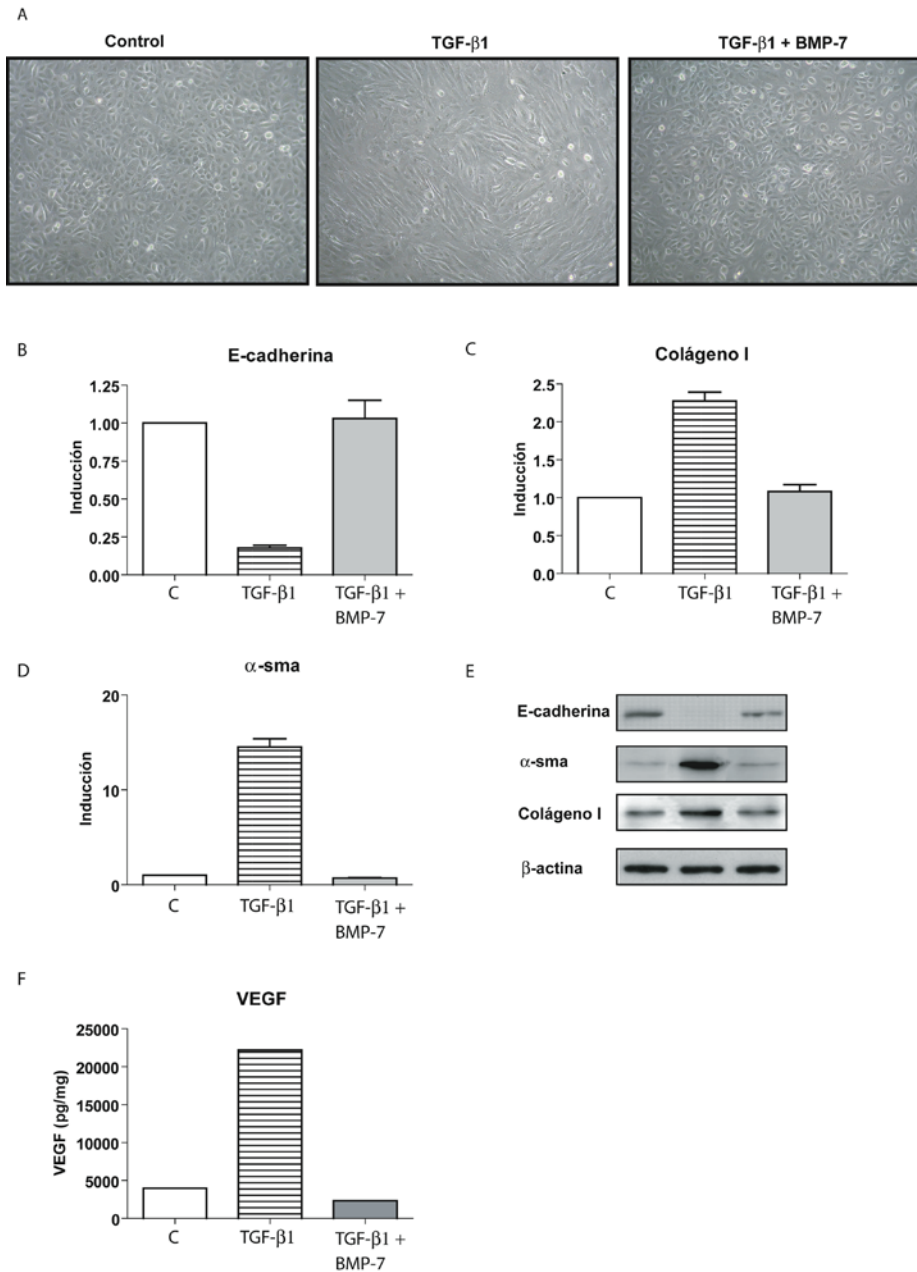


Figura 11. El BMP-7 bloquea la TEM de las células mesoteliales inducida por TGF-β1. Células mesoteliales derivadas de epiplón, tratadas durante 48 horas con 1 ng/ml de TGF-β1, en la presencia o ausencia de 0.5 µg/mL de BMP-7. (A). La microscopía de contraste de fase muestra que el tratamiento con BMP-7 previene la adquisición del fenotipo no-epitelioide de las células mesoteliales. Aumento 200 x. (B-D). El análisis de western blot muestra que el tratamiento con BMP-7 previene la bajada de expresión de E-cadherina, inducida por TGF-β1 (B), así como la subida de expresión de colágeno I (C) y α-SMA (D). El experimento fue repetido tres veces, y los resultados se muestran como media + desviación estándar. (E). Se muestra un experimento representativo. (F). El análisis de la expresión de VEGF, mediante ELISA, demuestra que la adición de BMP-7 es capaz de prevenir la subida de expresión de esta citoquina, causada por la exposición a TGF-β1. Las barras representan los valores obtenidos por el ELISA y se muestran como picogramos por miligramo del total de proteína celular. Se muestra un experimento representativo.

6.1.3. BMP-7 disminuye la alteración estructural del peritoneo en un modelo de rata de exposición peritoneal

La TEM de las células mesoteliales es un proceso importante en la disfunción de la membrana peritoneal. Dado que el BMP-7 es capaz de bloquear dicha transformación, nos dispusimos a analizar los efectos producidos por un tratamiento de rhBMP-7 en un modelo de rata de diálisis peritoneal. Con este objetivo, se instalo, mediante cirugía, un catéter peritoneal a un grupo de ratas. Fueron instiladas en el peritoneo con líquido de diálisis a diario, durante un tiempo total de 5 semanas. Se instiló una solución estándar (con alto contenido en PDGs) y las ratas fueron tratadas o no con rhBMP-7 (grupos PDF o PDF+BMP-7 respectivamente), el cual fue diluido en el propio líquido. Un grupo de ratas que no fueron sometidas a cirugía, y no siguieron ningún tratamiento, sirvió como grupo control (grupo control).

La inflamación peritoneal y la reparación tisular son respuestas tempranas a la exposición peritoneal al líquido de diálisis. Se sabe que este proceso es capaz de inducir la TEM de las células mesoteliales, la activación de los fibroblastos y la acumulación de componentes de matriz extracelular y angiogénesis (Aroeira *et al.*, 2007). Debido a ello, analizamos si la exposición a rhBMP-7 presenta algún efecto sobre el reclutamiento celular en el interior de la cavidad peritoneal. También estudiamos el efecto de esta citoquina sobre la producción local de ácido hialurónico (marcador de daño peritoneal) y la respuesta regenerativa. Como se muestra en la tabla 6, el tratamiento con rhBMP-7 sólo afecto de manera significativa a la reducción en la producción del ácido hialurónico ($p=0.054$), lo cual sugiere una mejora en la preservación del peritoneo (Lipkin *et al.*, 1993).

	Control	PDF	PDF+BMP-7
Células peritoneales totales (x10 ⁶)	23.5±3.6	214.5±51.7 ^a	205.4±182.4 ^a
Macrofagos %	72.8±6.1	65.6±35.7	74.75±21
Linfocitos %	0.5±0.7	0.8±0.5	0.25±0.25
Neutrófilos %	2.4±1.7	27.3±31.4 ^b	21.25±20.5 ^a
Eosinófilos %	11.5±3.3	4.6±8.1 ^a	1.5±2 ^a
Mastocitos %	12.25±5.5	0.1±0.3 ^a	0.25±0.25 ^a
Huellas de hígado (células/mm ²)	1168±273	2045±548 ^a	2193±544 ^a
Ácido hialurónico	21.4±24.6	2424.9±2896.8 ^a	1090±1131.6 ^a

Tabla 6. Composición de leucocitos peritoneales, "huellas de hígado" y ácido hialurónico. a p<0.01 versus Control; b p<0.05 versus Control

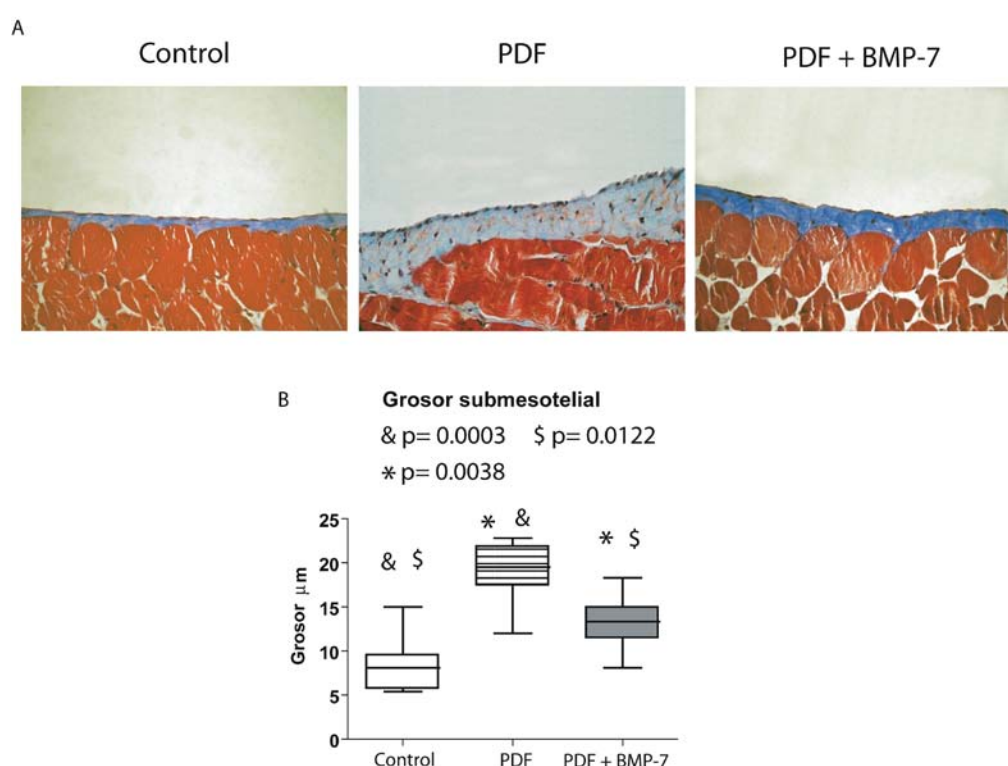


Figura 12. Efecto del BMP-7 en el grosor del peritoneo parietal de ratas expuestas a líquido de diálisis. (A). Tinción con tricrómico de Masson muestra un incremento en la deposición de componentes de matriz extracelular en las ratas expuestas al líquido de diálisis (PDF). El tratamiento con BMP-7 se muestra capaz de reducir dicho efecto. (B). El grosor peritoneal se encuentra aumentado en el grupo PDF (n=8) comparado con las ratas control (N=8), y el grupo PDF + BMP-7 (n = 12) muestra una reducción significativa en el grosor cuando se compara con el grupo PDF. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, mediana, mínimo y máximo. Los símbolos muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. Aumento 200 x.

También se analizó el grado de fibrosis de los diversos grupos de tratamiento. Su estimación se realizó a través de la medida del grosor de la membrana peritoneal. Un mayor engrosamiento es producido por depósitos de componentes fibróticos. El análisis histológico de las biopsias del peritoneo parietal, muestra que la exposición al líquido de diálisis resulta en un

incremento en el grosor peritoneal en comparación con el grupo control (figura 12). También analizamos la acumulación de células mesoteliales transdiferenciadas en la zona submesotelial (figura 13). Para ello, marcamos las células con anticuerpos anti-Pan-citoqueratina (marcador mesotelial), así como con anti-FSP-1 (marcador de fibroblastos) (Liu, 2004). La administración de rhBMP-7 logra reducir significativamente, tanto el grosor peritoneal, como la aparición de células citoqueratina positivas, en la zona submesotelial (figuras 12 y 13). Interessantemente, los datos muestran una correlación positiva ($r = 0.592$; $p = 0.0047$) entre el grosor de la membrana y el número de células citoqueratina positivas observadas. Este es un dato que indica la importancia del proceso de TEM de las células mesoteliales en la fibrosis peritoneal (figura 13 C).

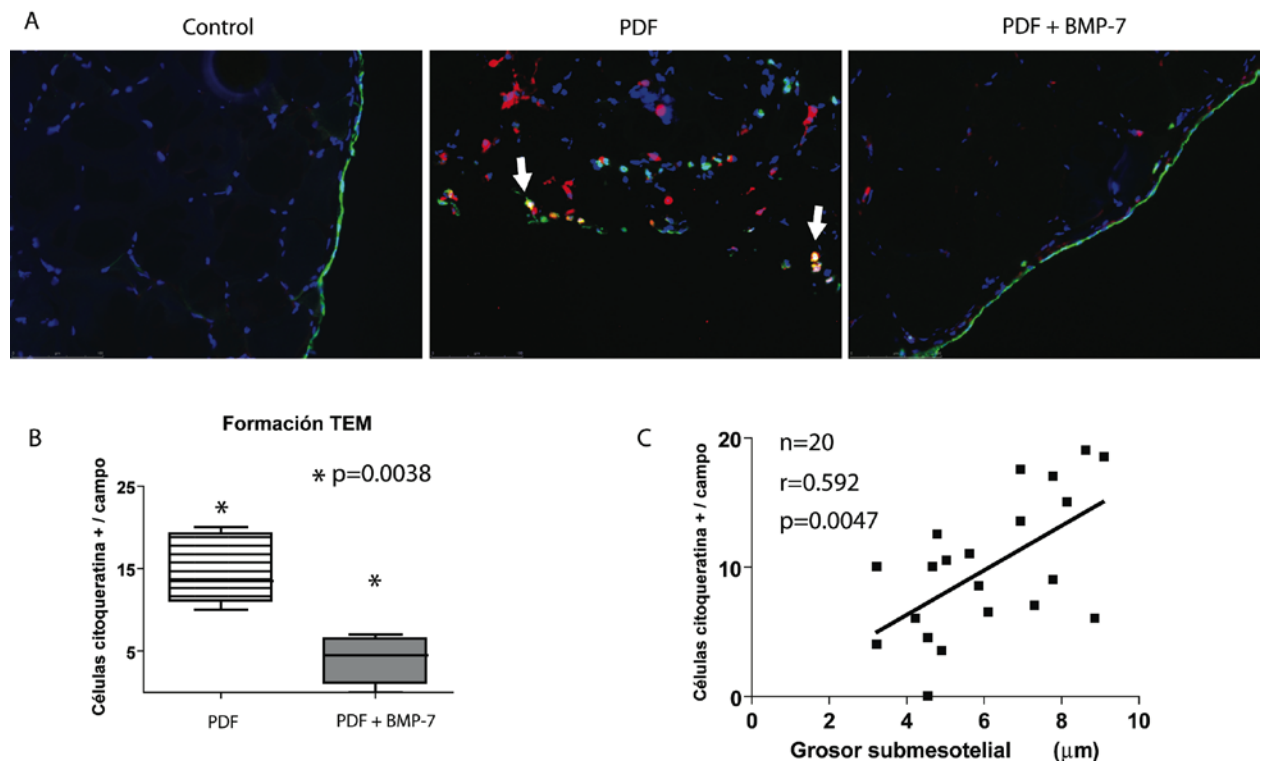


Figura 13. Efecto del BMP-7 sobre el número de células mesoteliales transdiferenciadas en la zona compacta del peritoneo parietal. (A) Inmunofluorescencia, de secciones del peritoneo parietal, teñidas con anticuerpos anti-Pan-citoqueratina (verde) y anti-FSP-1 (rojo). Se observa una acumulación de células mesoteliales transdiferenciadas, en el espacio submesotelial (células citoqueratina positiva). Algunas de estas células también muestran expresión de FSP-1 (flechas), en el grupo PDF. La administración de BMP-7 reduce el número de células positivas para citoqueratina, en la región submesotelial (PDF + BMP-7). Aumento 200 x. (B). La reducción del número de células mesoteliales que han invadido la zona compacta, causada por BMP-7, es significativa. Las cajas muestran los percentiles 25 y 75, mediana, mínimo y máximo. Los símbolos muestran las diferencias estadísticas entre grupos. (C). Correlación entre el grosor submesotelial y el número de células citoqueratina positivas en la zona compacta, en el total de las ratas tratadas con líquido de diálisis (Regresión de Spearman, $P = 0.0047$; $n = 20$).

La exposición del peritoneo al líquido de diálisis también resulta en un reclutamiento de macrófagos activados (ED2) y en la formación de nuevos vasos (CD31) en el peritoneo parietal (figura 14 A). El tratamiento con rhBMP-7 resulta en una reducción significativa de la angiogénesis (figura 14 C). Sin embargo, el número de macrófagos presentes en la cavidad peritoneal no se encuentra afectado (figura 14 B). Como en el caso anterior, se encontró una correlación positiva ($r = 0.593$; $p = 0.0058$) entre el número de células citoqueratina positivas encontradas en el peritoneo parietal y la angiogénesis (figura 14 D). Esta relación sugiere, que la TEM de las células mesoteliales, es un proceso clave, no sólo en la fibrosis peritoneal, sino también en la angiogénesis.

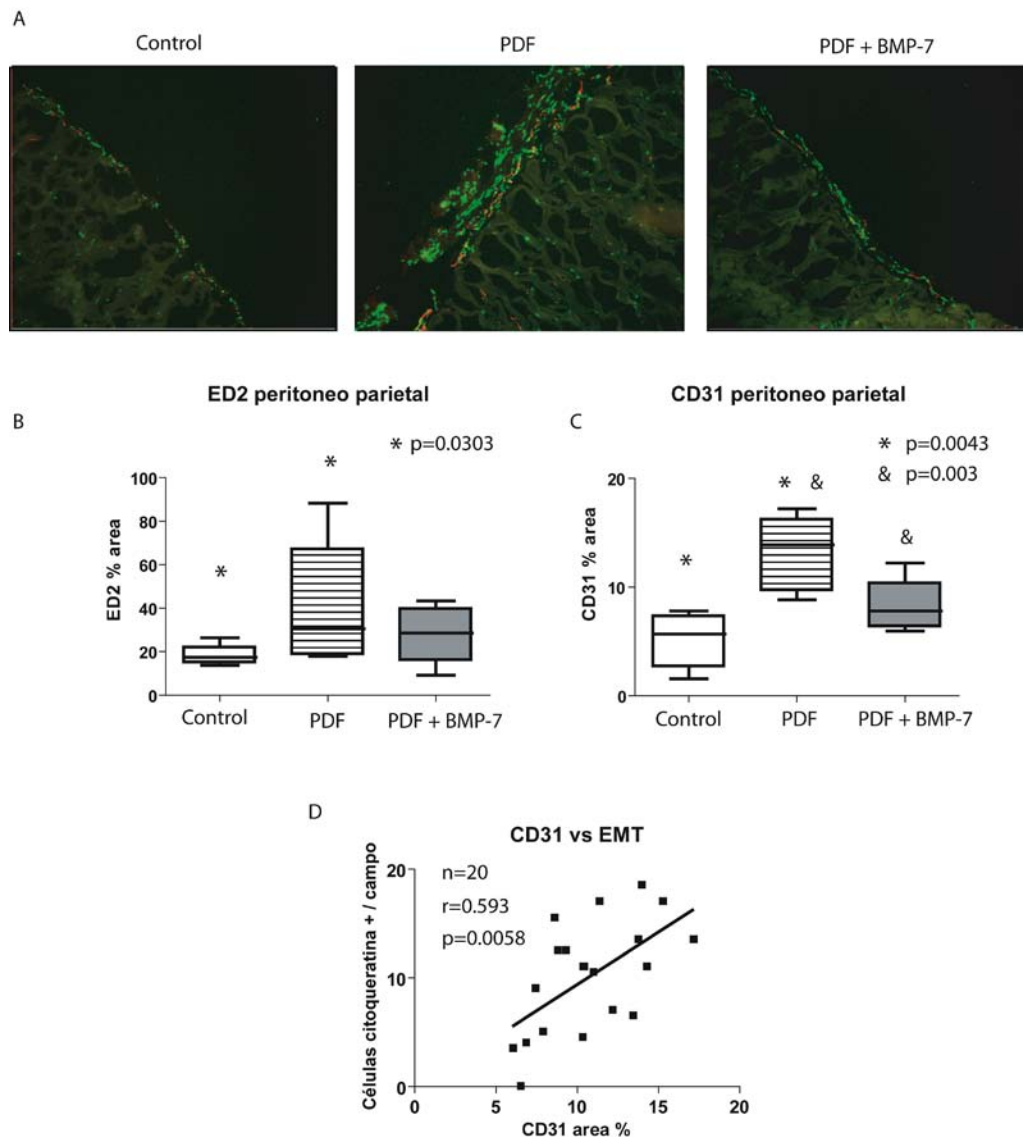


Figura 14. Efecto del BMP-7 en el reclutamiento de macrófagos y angiogénesis en el peritoneo parietal. (A). El análisis mediante inmunofluorescencia de las secciones del peritoneo parietal de ED2 (verde) y CD31 (rojo) muestra acumulación de macrófagos y de vasos, en las ratas expuestas a líquido de diálisis (PDF). Aumento 400 x. (B, C). La administración de BMP-7 (PDF + BMP-7) no afecta al reclutamiento de los macrófagos (B), pero reduce de manera significativa el número de vasos (C). El área positiva de las tinciones ED2 y CD31 fue calculada como el porcentaje del área total de la zona compacta. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, la mediana y el mínimo y máximo. Los símbolos muestran las diferencias significativas entre grupos. (D). Correlación entre el área de CD31 y el número de células citoqueratina-positivas por campo, en la zona compacta del peritoneo parietal de las ratas tratadas con líquido de diálisis (Regresión de Spearman, $P = 0.0058$; $n = 20$).

6.2. Inhibición de COX-2

6.2.1. La sobreexpresión de COX-2 de las células mesoteliales de pacientes en diálisis peritoneal, está asociada a TEM

Se analizó la asociación entre el aumento de expresión de COX-2 con el proceso de la TEM de las células mesoteliales, que tiene lugar durante la

disfunción de la membrana peritoneal. Las células mesoteliales extraídas del efluente de 23 pacientes en diálisis peritoneal, fueron agrupadas según el fenotipo mostrado en cultivos celulares en confluencia (Figura 15 A). Se agruparon según criterios fenotípicos y la expresión de diversos marcadores, en células epitelioideas y no-epitelioideas. Estas últimas han sufrido o iniciado la TEM. Como control, se utilizaron células mesoteliales extraídas de muestras de epiplón de 5 pacientes no-urémicos. En la tabla 7 se observan las características basales de los pacientes y las diferencias entre los subgrupos.

	Población estudiada (n=23)	Fenotipo células mesoteliales		P
		Epitelioide (n=13)	No-epitelioide (n=10)	
Edad (años)	67.88 ± 14.60	65.20 ± 11.10	68.20 ± 16.00	NS
Tiempo en DP (meses)	9.47 ± 7.44	8.80 ± 5.00	11.30 ± 8.40	NS
EPO (U/Kg por semana)	88.80 ± 54.10	80.10 ± 46.20	93.50 ± 52.10	NS
Inflamación (d) ^b	1.80 ± 0.840 (1.00-3.00)	0.00 ± 0.00	1.80 ± 0.84	0.0001
Carga de glucosa (Kg)	44.10 ± 28.10	42.20 ± 22.60	48.50 ± 31.10	NS
Urea-MTC (ml/min)	22.10 ± 3.30	20.80 ± 3.23	23.92 ± 2.60	NS
Cr-MTC (ml/min)	10.80 ± 7.30	9.70 ± 1.00	12.43 ± 2.60	0.06 (NS)
UF 3.86% (ml) ^c	641.70 ± 89.30	650.00 ± 57.70	631.00 ± 121.00	0.08 (NS)
CCr (ml/min)	1.30 ± 3.40	1.50 ± 2.90	0.90 ± 3.70	NS
COX-2 mRNA (UR)	3.56 ± 2.75	1.70 ± 1.00	5.98 ± 2.33	0.0001
Snail mRNA (UR)	2.00 ± 1.40	1.43 ± 0.40	2.75 ± 1.87	0.0120

Tabla 7. Características de los pacientes en diálisis peritoneal con diferentes fenotipos de células mesoteliales, extraídas de los efluentes. Los datos se corresponden con la media ± desviación estándar. CCr, aclaramiento de creatinina; EPO, eritropoyetina recombinante humana; UF, ultrafiltración. ^b Los fenotipos de las células mesoteliales muestran una asociación con episodios de peritonitis o hemoperitoneo. Ninguno de los pacientes, con células mesoteliales epitelioideas en sus efluentes, experimentó dichas patologías. Sin embargo, el 50% (5 de 10) de los pacientes que drenaban células no-epitelioideas, tuvieron episodios de peritonitis (n=3) o de hemoperitoneo (n=2; Test exacto de dos colas de Fisher, p=0.05). ^c Intercambio peritoneal con líquido de diálisis de glucosa al 3.86% durante 4 horas.

La cuantificación de COX-2, en los extractos celulares, fue llevada a cabo mediante RT-PCR. Se puede ver como la expresión de COX-2 *ex vivo* aumenta según avanza el proceso de la TEM, alcanzando un aumento máximo en las células mesoteliales de fenotipo no-epitelioide (figura 15 B). El estudio de la expresión de Snail, un reconocido marcador de TEM, muestra también un aumento a través del proceso de transdiferenciación al fenotipo mesenquimal (figura 15 C). La expresión de Snail y COX-2 muestra una correlación significativa, ya que ambas se ven aumentadas tras el proceso de la TEM (figura 15 D). Interesantemente, el fenotipo de las células mesoteliales extraídas de los pacientes, mostro una asociación con el tipo de líquido empleado por los pacientes. En la tabla 8 puede verse la relación de los pacientes y los diversos líquidos de diálisis que empleaban. A todos los pacientes (siete de siete) tratados con líquidos considerados estándar (con alto contenido en PDGs), se le extrajeron del efluente, células mesoteliales con

fenotipo no-epiteliode. Aquellos pacientes tratados con líquidos que contenían bajas concentraciones de PDGs, así como aquellos pacientes que fueron tratados con líquidos estándar, pero con un intercambio diario de líquido con icodextrina como agente osmótico, mostraron un 33 y 0% de células no-epitelioides respectivamente (Test exacto de Fisher de dos colas, altos PDGs vs bajos PDGs, $p = 0.01$; altos PDGs vs icodextrina, $p = 0.001$). Además, la expresión de Snail también muestra una relación con el tipo de líquido utilizado por los pacientes durante la diálisis peritoneal. Su expresión se encuentra significativamente elevada, en aquellos pacientes tratados solamente con líquidos estándar, comparado con aquellos tratados con líquidos bajos en PDGs y con los pacientes que reciben un intercambio diario, con líquido basado en icodextrina como agente osmótico (figura 15 E). La expresión de COX-2 también se ve aumentada en los fluidos estándar, en comparación con los que usan el líquido de icodextrina, pero este cambio no llega a alcanzar la significación estadística.

	Diálisis peritoneal continua ambulatoria (n=7)		Diálisis peritoneal automatizada (n=16)		
	Con Icodextrina (Ex)	Sin Icodextrina (Ex)	Con Icodextrina (Ex)	Sin Icodextrina (Ex)	Total
Bajos PDGs	0	2 (Ba)	0	7 (3Ba + 4Bv)	9
Altos PDGs	5 (Di)	0	2 (Di)	7 (Di)*	14
Total	5	2	2	14	23

Tabla 8. Distribución de los pacientes según el tratamiento de dialysis peritoneal recibido. Ba: *Balance*; 1.5, 2.3, o 4.25 % glucosa; 35 mmol/L lactato; baja concentración de PDGs; pH 7-7.4; n=5; Fresenius Medical Care, Alemania. Bv: *BicaVera*; 1.5, 2.3, o 4.25 % glucosa; 35 mmol/L bicarbonato; baja concentración de PDGs; pH 7.4; n=4; Fresenius Medical Care, Alemania. Di: *Dianeal*; 1.36, 2.27 o 3.86 % glucosa, 35 mmol/L lactate; alta concentración de PDGs; pH 5.2; n=14; Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, Estados Unidos. Ex: *Extraneal*; 7.5 % icodextrina; 40 mmol/L lactato; baja concentración de PDGs; pH 5.6; n=7; Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, Estados Unidos.

* Estos 7 pacientes en diálisis peritoneal automatizada no usaron *extraneal* ya que eran altos transportadores.

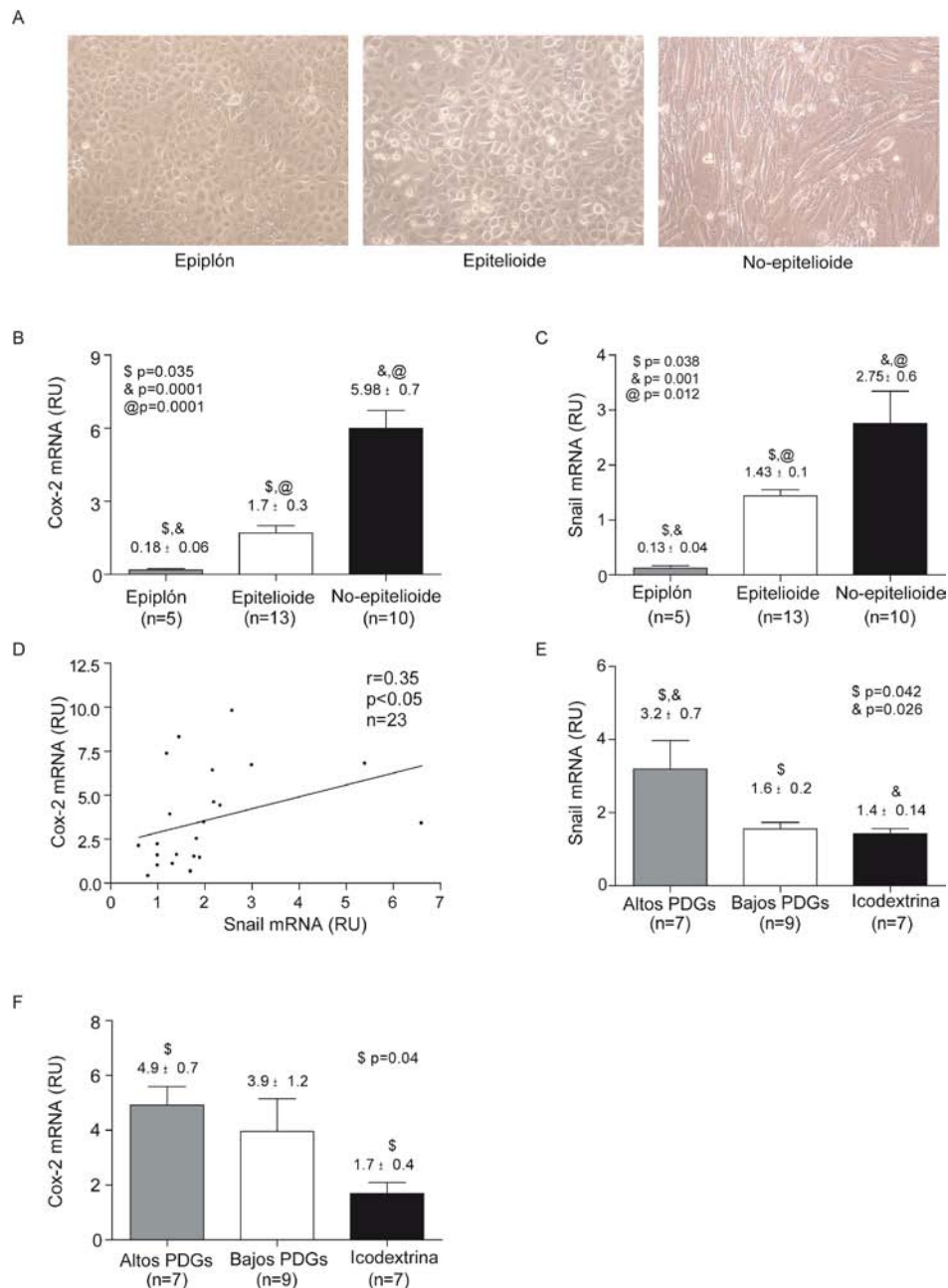


Figura 15. Expresión de Snail y COX-2 en células mesoteliales de epiplón y en las extraídas de efluentes. (A) Imágenes de microscopía de contraste de fases, muestran las diferentes características morfológicas de las células mesoteliales. (Izquierda) Típico fenotipo de las células mesoteliales. (Medio y derecha) Células mesoteliales con fenotipo epiteliode y no-epiteliode. (B) Diferencias en la expresión de mRNA de COX-2 en los diferentes fenotipos de las células mesoteliales. (C) Diferencias en la expresión de mRNA de Snail en los diferentes fenotipos de las células mesoteliales. (D) Correlación lineal entre los niveles de expresión del mRNA de COX-2 y Snail en células mesoteliales derivadas de efluente. (E) Diferencias en la expresión de mRNA de Snail en pacientes tratados con fluidos con alto contenido en PDGs, o bajo contenido en PDGs, o recibiendo un intercambio diario de fluido basado en icodextrina (Icodextrina). (F) Diferencias en expresión de mRNA de COX-2 de las células mesoteliales de pacientes tratados con diferentes líquidos de diálisis. Las barras representan la media \pm error estándar. Los símbolos muestran las diferencias significativas entre grupos.

6.2.2. COX-2 sufre un aumento de expresión durante la TEM de las células mesoteliales en condiciones *in vitro*

La inducción de expresión de COX-2, que tienen lugar durante la TEM, fue confirmada en experimentos *in vitro*. Como puede verse en la figura 16 A, las células mesoteliales extraídas de epiplón, estimuladas con TGF- β 1 + IL-1 β , muestran expresión de mRNA de COX-2, que además se correlaciona de una manera positiva con la expresión de mRNA de Snail (figura 16 A y B). También se analizaron los niveles de proteínas, mediante western blot, en los cultivos de células mesoteliales estimulados o no con TGF- β 1 + IL-1 β . Se observó que la exposición a dichas citoquinas, causaba un aumento de expresión de las proteínas de COX-2 y de fibronectina (marcador de carácter mesenquimal) (figura 16 C). El aumento de expresión en las células mesoteliales de COX-2, durante el proceso de transdiferenciación a fenotipo mesenquimal, ha sido también verificado en experimentos de cierre de herida ("wound healing"). En estos experimentos se efectuó un daño mecánico sobre cultivos de células mesoteliales, que se encontraban en total confluencia (figura 16 D). También se estudio la expresión de COX-2, en cultivos de células mesoteliales cultivadas en medios, que presentan un 50% de líquido de diálisis. Se hizo uso de un líquido estándar, con alto contenido en PDGs y lactato como tampón, así como de un líquido más biocompatible, con una baja concentración de PDGs y con bicarbonato como tampón. El cultivo con líquido estándar desencadenó una progresiva pérdida de expresión de E-cadherina, indicativa de TEM, así como una rápida y fuerte inducción de PGE2 y de COX-2 (figura 17). Cuando las células mesoteliales fueron incubadas con el líquido de diálisis con propiedades más biocompatibles, las células no mostraron represión de E-cadherina, al contrario, se encontró una inducción de esta proteína tras 24 horas de cultivo (figura 17 A). La síntesis de PGE2 y de COX-2 se vio ligeramente inducida en estas condiciones de cultivo (figura 17 B y C). Resultados similares han sido obtenidos con otro líquido de diálisis, que contiene una pequeña cantidad de PDGs, y un tampón lactato (figura 18). Esto demuestra que los PDGs son claves en el establecimiento del proceso de TEM, en condiciones *in vitro*.

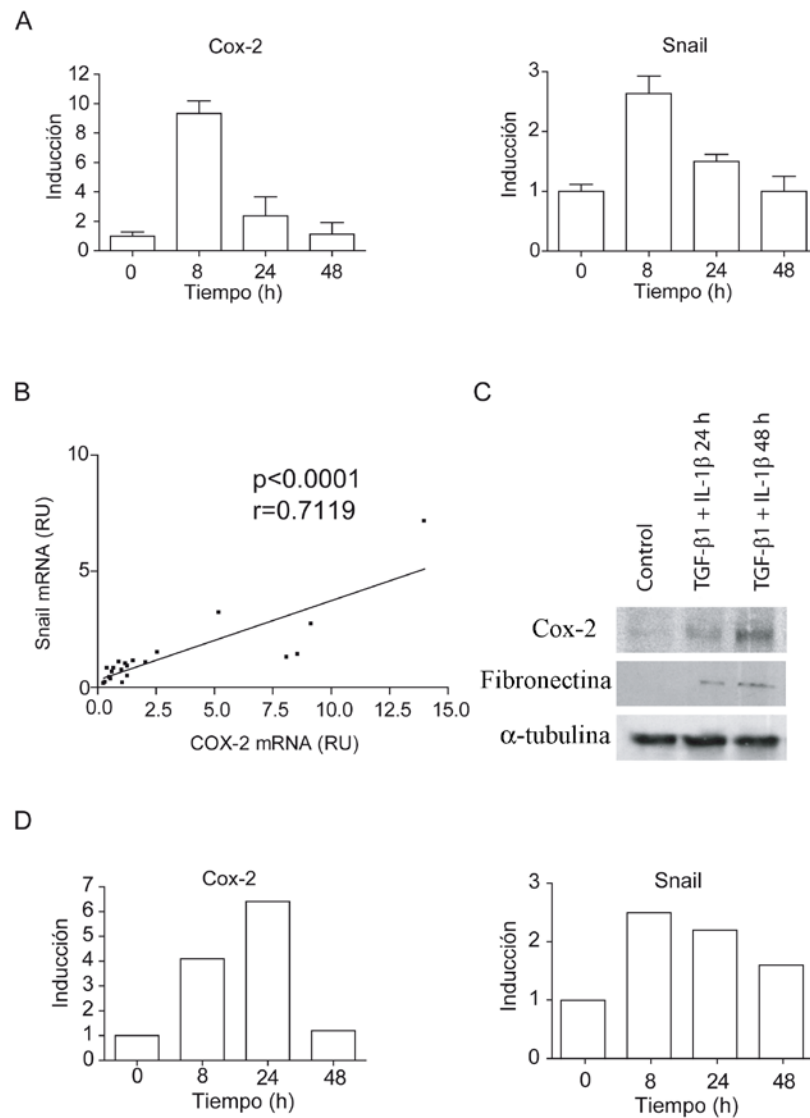


Figura 16. La TEM *in vitro* de las células mesoteliales conlleva un aumento de expresión de COX-2 y Snail. (De A a D) La TEM de las células mesoteliales fue inducida *in vitro* mediante la estimulación con TGF-β1 e IL-1β (De A a C) o mediante cierre de herida ("wound healing") (D). (A) Inducción de mRNA de COX-2 y Snail a 8, 24 y 48 horas en células mesoteliales extraídas de epiplón. (B) Correlación lineal entre la expresión de mRNA de COX-2 y Snail. (C) Western blot de la expresión de COX-2 y Snail a 24 y 48 horas. (D) Inducción de expresión de mRNA de COX-2 y Snail a las 8, 24 y 48 horas después de daño mecánico de la monocapa de células mesoteliales. Las barras en A representan la inducción sobre las células no tratadas y se expresan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras en la figura D muestran la inducción sobre células sin tratar, de un experimento representativo de tres experimentos realizados.

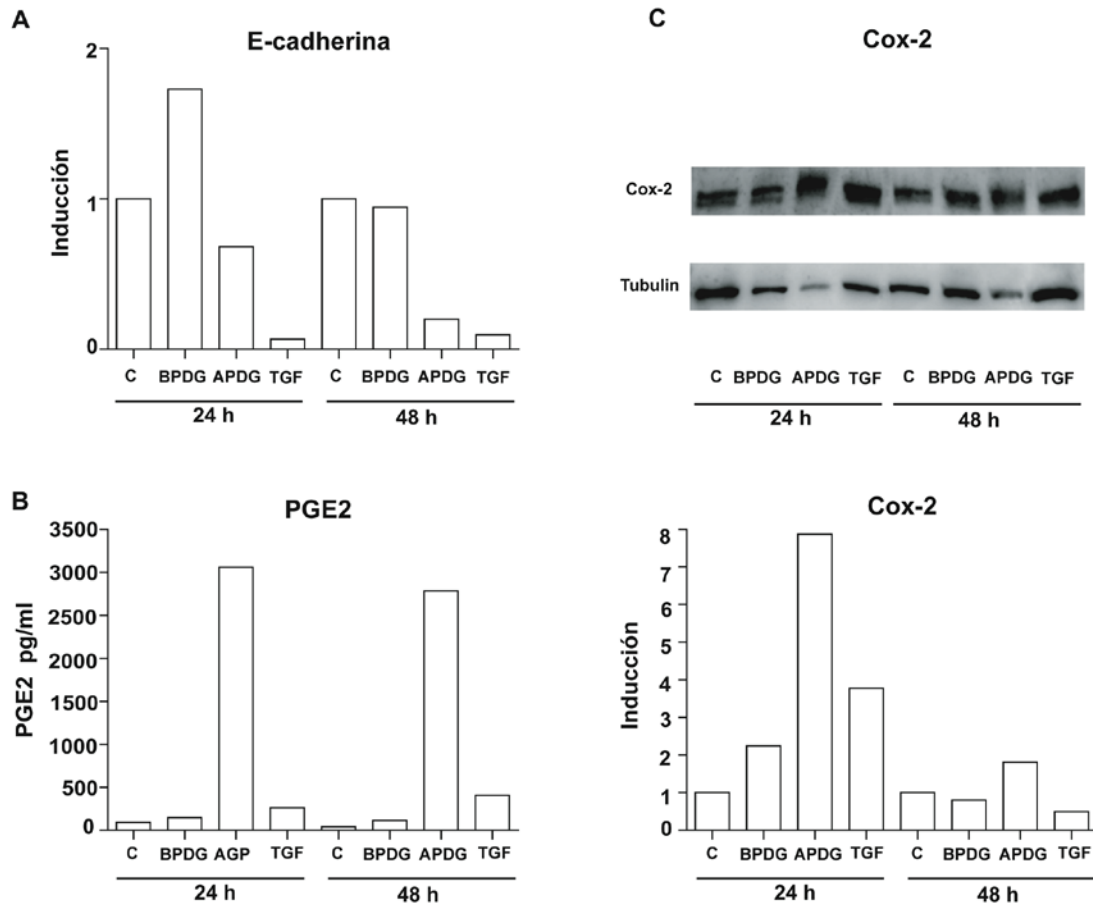


Figura 17. Los efectos de las soluciones estándar y bajas en PDGs sobre la TEM y la expresión de COX-2 de las células mesoteliales *in vitro*. Células mesoteliales, procedentes de epiplón, fueron incubadas durante 24 o 48 horas con medio control (C), líquido estándar, que contiene altos niveles de PDGs (APDG), o líquido con bajos niveles de PDGs (BPDG), diluidos con el medio a partes iguales. Otras células fueron tratadas con TGF- β 1 + IL-1 β (TGF- β 1). (A) La expresión de E-cadherina fue determinada mediante western blot. (B) La síntesis de PGE2 fue medida en el sobrenadante del medio de cultivo mediante ELISA. Los resultados se muestran en picogramos por miligramo del total de las proteínas celulares. (C) La expresión del COX-2 fue analizada por western blot. Las barras en A y C representan la inducción de la expresión de E-cadherina y COX-2 sobre el control, después de la normalización con la expresión con tubulina. El experimento fue repetido al menos tres veces, mostrando los resultados de un experimento representativo.

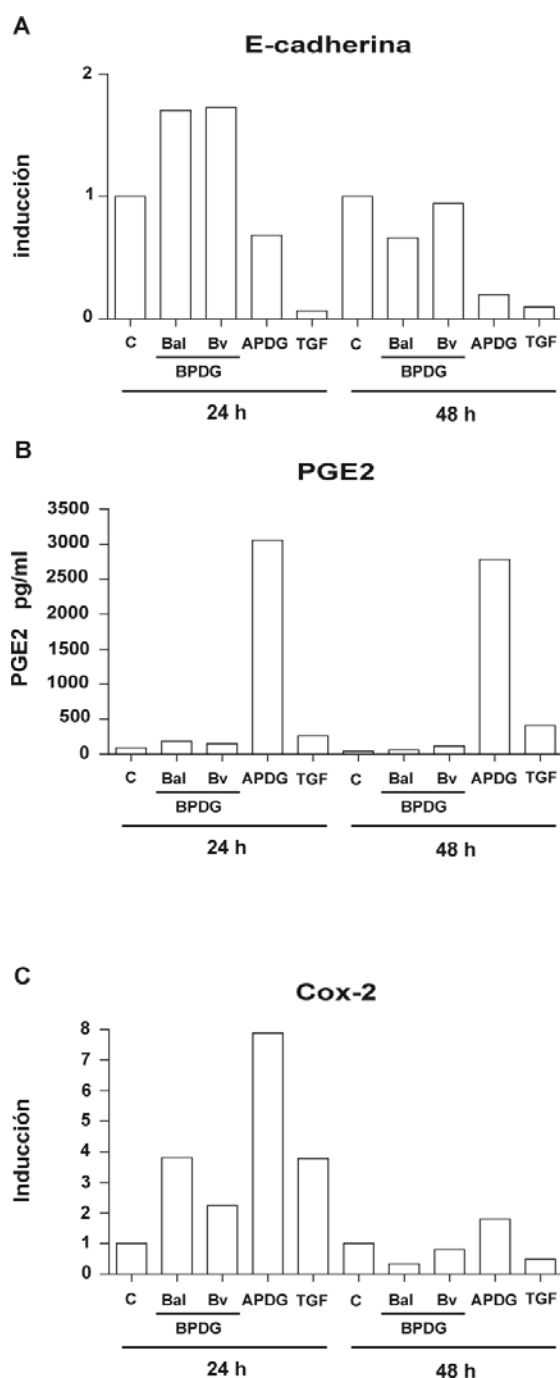


Figura 18. Los efectos de las soluciones estándar y bajas en PDGs sobre la TEM y la expresión de COX-2 de las células mesoteliales *in vitro*. Células mesoteliales, procedentes de epiplón, fueron incubadas durante 24 o 48 horas con medio control (C), líquido estándar, que contiene altos niveles de PDGs (APDG), o líquidos con bajos niveles de PDGs (BPDG; uno con lactato como tampón (Bal) y otro con bicarbonato (Bv) diluidos con el medio a partes iguales. Otras células fueron tratadas con TGF- β 1 + IL-1 β (TGF- β 1). (A) La expresión de E-cadherina fue determinada mediante western blot. (B) La síntesis de PGE2 fue medida en el sobrenadante del medio de cultivo mediante ELISA. Los resultados se muestran en picogramos por miligramo del total de las proteínas celulares. (C) La expresión del COX-2 fue analizada por western blot. Las barras en A y C representan la inducción de la expresión de E-cadherina y COX-2 sobre el control, después de la normalización con la expresión con tubulina. El experimento fue repetido al menos tres veces, mostrando los resultados de un experimento representativo.

6.2.3. Correlación *ex vivo* entre la expresión de COX-2 y el transporte peritoneal

Los datos que presentamos indican que la sobre-expresión local de COX-2, por parte de las células mesoteliales, podría jugar un importante papel en el fallo funcional de la membrana peritoneal. Para corroborarlo, estudiamos la relación existente entre los niveles de expresión de COX-2 de las células mesoteliales extraídas de los efluentes de pacientes en diálisis peritoneal, con los datos de función peritoneal de los mismos. En este caso se encontró una alta correlación ($r = 0.6$, $p < 0.001$) entre los niveles de expresión de COX-2 y el coeficiente de masa de transferencia de creatinina (Cr-MTC; Figura 19 A), indicador del funcionamiento del transporte peritoneal. Si subdividimos la población de pacientes en dos grupos atendiendo al funcionamiento de su peritoneo —Cr-MTC ≤ 11 ml/min (bajos transportadores) y Cr-MTC > 11 (altos transportadores)— observamos como los niveles de expresión de COX-2 son significativamente mayores ($p < 0.001$) en el segundo grupo (Figura 19 B), que se corresponde con el de aquellos pacientes con un peor funcionamiento dialítico. De acuerdo con nuestro estudio anterior (Aroeira *et al.*, 2005), el Cr-MTC está asociado también con el fenotipo de las células mesoteliales recogidas del efluente de los pacientes en diálisis peritoneal. Ninguno de los pacientes con células mesoteliales epitelioides en sus efluentes, mostraba Cr-MTC > 11 , mientras el 80 % (8 de 10) de los pacientes con células mesoteliales no-epitelioides mostraba Cr-MTC > 11 (test exacto de Fisher de dos colas, $p < 0.01$). Estos resultados sugieren que el aumento de expresión de COX-2, durante la TEM de las células mesoteliales, puede jugar un papel importante en el establecimiento de la respuesta inflamatoria. Todo ello puede conllevar finalmente, al deterioro de la membrana peritoneal de los pacientes en diálisis peritoneal.

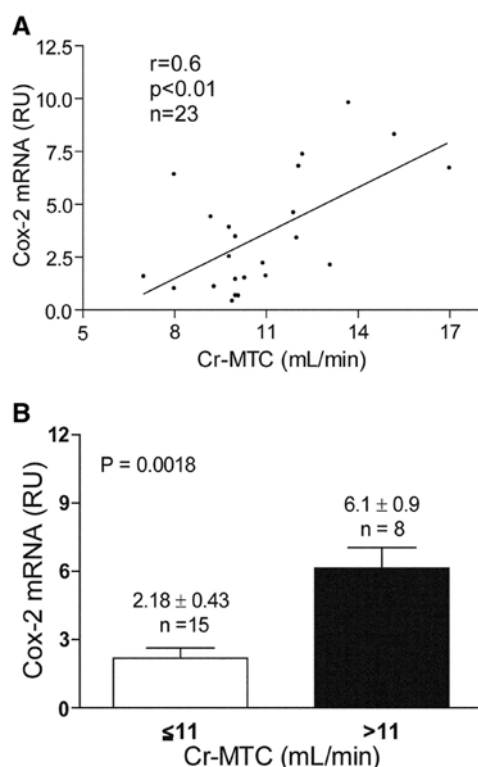


Figura 19. Expresión de COX-2 en células mesoteliales procedentes de los efluentes de pacientes en diálisis peritoneal y su relación con el transporte peritoneal. (A) Correlación lineal entre la expresión de mRNA de COX-2 y el MTC-creatinina en los pacientes en diálisis. (B) Diferencias en la expresión de mRNA de COX-2 en las células mesoteliales obtenidas con altos y bajos niveles de transporte (MTC-Cr ≤ 11 vs >11 ml/min). Las barras representan media \pm error estándar.

6.2.4. El bloqueo *in vitro* de COX-2 no tiene efecto sobre la TEM de las células mesoteliales

Dado que la expresión de COX-2 se encuentra aumentada durante la transdiferenciación de las células mesoteliales, investigamos que papel juega COX-2 en el proceso de la TEM. Para ello, hicimos uso del inhibidor selectivo de COX-2 NS398, en el modelo *in vitro* de TEM. Los resultados muestran que el inhibidor no es capaz de parar el cambio fenotípico inducido por la exposición a TG- $\beta 1$ +IL-1 β . Tampoco es capaz de impedir la caída de expresión de E-cadherina (figura 20 A y B), signo de que la TEM ha comenzado. Como era de esperar, el inhibidor NS398 es capaz de impedir la síntesis de su metabolito PGE2 (figura 20 C). Por el contrario, dicho inhibidor no es capaz de afectar la subida de expresión de moléculas asociadas al proceso de TEM, incluyendo componentes de matriz como fibronectina (figura 20 D), así como el factor pro-angiogénico VEGF (figura 20 E). Estos resultados demuestran que COX-2 es inducido durante la TEM, pero que no presenta un

papel en la conversión celular. Por lo tanto, se puede razonar que el aumento de COX-2 durante la TEM es una consecuencia del proceso, no un efector.

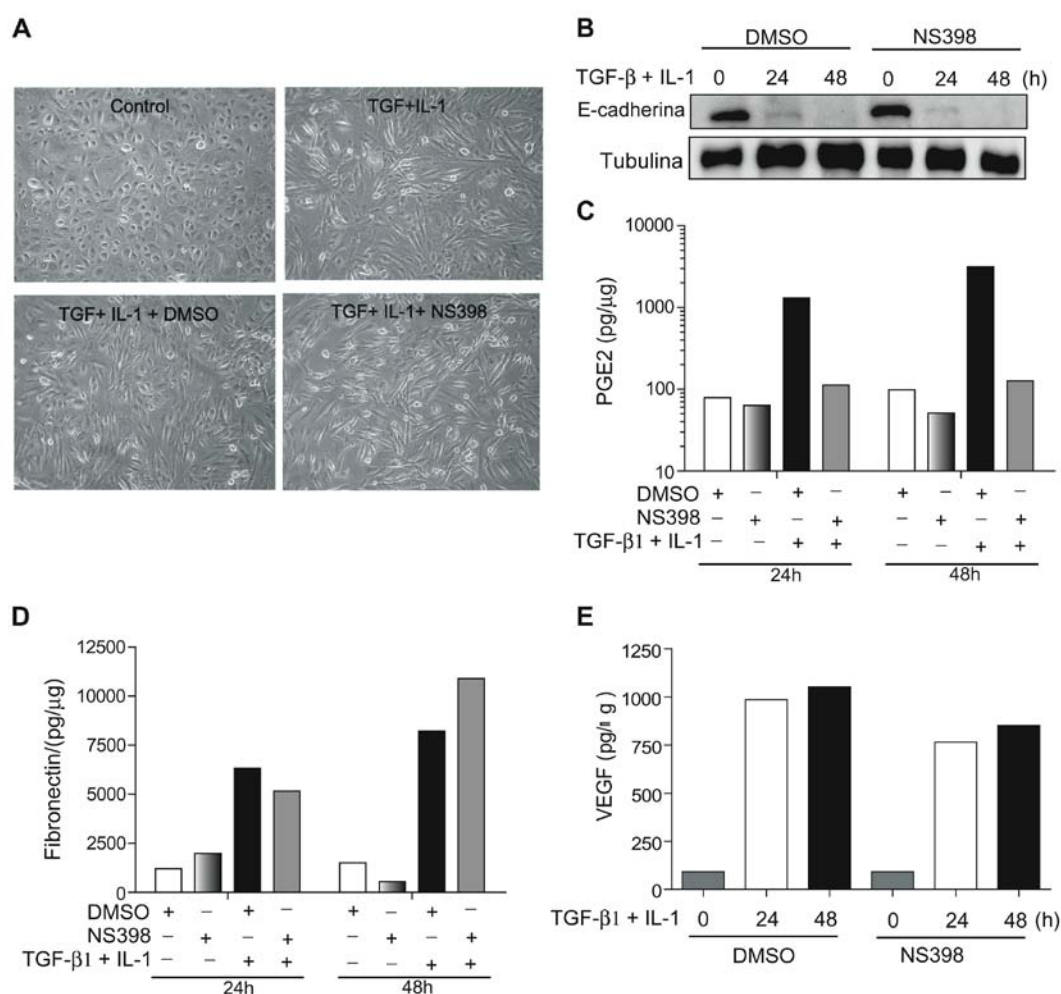


Figura 20. La inhibición de COX-2 no afecta la TEM in vitro de las células mesoteliales, inducida por TGF- β 1 + IL-1 β , en la presencia del inhibidor de COX-2 (NS398) o placebo (DMSO). (A) Las imágenes de microscopio de contraste de fases, muestran que el inhibidor de COX-2 no previene la adquisición de fenotipo no-epiteliode de las células mesoteliales a 48 horas. (B) El análisis mediante western blot muestra que la inhibición de COX-2 no evita la bajada de E-cadherina. (C) La inhibición de COX-2 impide la sobreexpresión de PGE2. (D) La inhibición de COX-2 no bloquea la síntesis de fibronectina. (E) la inhibición de COX-2 no afecta a la producción de VEGF. Las barras de C a E muestran los valores obtenidos por el ELISA.

6.2.5. La inhibición de COX-2 disminuye la inflamación y el daño peritoneal inducido por líquido de diálisis en ratones

La inflamación del peritoneo es una respuesta temprana a la exposición al líquido de diálisis peritoneal. Este proceso puede provocar la inducción de la TEM de las células mesoteliales, la acumulación de matriz extracelular y

angiogénesis. Debido a ello, se analizó si la acción anti-inflamatoria del inhibidor de COX-2, conocido como celecoxib, puede prevenir el deterioro de la membrana peritoneal, en un modelo de ratón de exposición a líquido de diálisis. Los ratones fueron instilados con líquido de diálisis estándar (altos PDGs y lactato como tampón), tras la implantación de un catéter peritoneal. Los ratones fueron instilados diariamente durante un total de 5 semanas y tratados por vía oral con celecoxib o placebo. Como grupo control se utilizaron ratones que fueron instilados diariamente con 1 ml de salino durante un total de 5 semanas. Estos ratones también fueron sometidos a una cirugía previa, con el fin de la instalación del catéter peritoneal.

El análisis histológico de las biopsias correspondientes al peritoneo parietal de los animales, muestra un incremento en inflamación, acumulación de matriz extracelular y fibrosis, comparando las muestras con las de los animales tratados con salino. La administración del inhibidor de COX-2, redujo de manera significativa todos estos cambios morfológicos. No se encontraron diferencias significativas entre los ratones instilados con salino y tratados o no con celecoxib (figura 21 A y B).

Para observar el efecto del celecoxib sobre la angiogénesis, las muestras fueron sometidas a tinción con anticuerpo anti-CD31. Aquellos ratones tratados con líquido de diálisis mostraron un aumento significativo en el número de vasos, comparado con aquellos animales tratados con salino. La administración de COX-2 resultó en una pequeña reducción en el número de vasos encontrados, que no llegó a la significación estadística (figura 21 C y D). Además de los estudios morfológicos, también se llevó a cabo un estudio funcional. Se basa en un test de equilibrio peritoneal de 90 minutos, al que se sometió a cada uno de los ratones, momentos antes del sacrificio y posterior toma de muestras. Como se muestra en la figura 6 E, el volumen recuperado de animales tratados con el líquido de diálisis, es menor que el recogido en el grupo de ratones tratados con salino. Los animales tratados con celecoxib mostraron una recuperación parcial del volumen recogido. También se quiso evaluar el efecto de la inhibición de COX-2, en la respuesta inflamatoria temprana que tiene lugar en el peritoneo. Con este objetivo se realizó un experimento con el mismo planteamiento que el relatado anteriormente, con la única diferencia de que en este caso, la duración del tratamiento fue de 15

días. El análisis de las células inflamatorias extraídas de los efluentes de dichos ratones, muestra una disminución significativa del número total de células en los ratones tratados con celecoxib, frente a los que solamente fueron tratados con líquidos de diálisis. Esta disminución fue más acusada en macrófagos (CD11b⁺), alcanzando la significación estadística. El número de células T recogidas (CD3⁺) también sufrió una disminución bajo el tratamiento de celecoxib, en este caso, sin alcanzar la significación estadística (figura 21 F). Estos resultados muestran que la inhibición de COX-2, logra reducir los efectos perjudiciales en el peritoneo, como consecuencia de la exposición al líquido de diálisis. Los datos revelan que el celecoxib es capaz de disminuir la fibrosis e inflamación, así como causar una mejora en el aspecto funcional. Se puede concluir, según los datos observados, que la inflamación es el proceso que se encuentra en la cabeza de la fibrosis peritoneal, así como en la permeabilidad vascular. Así mismo, parece que diversos factores no dependientes de la inflamación operan en la formación de nuevos vasos.

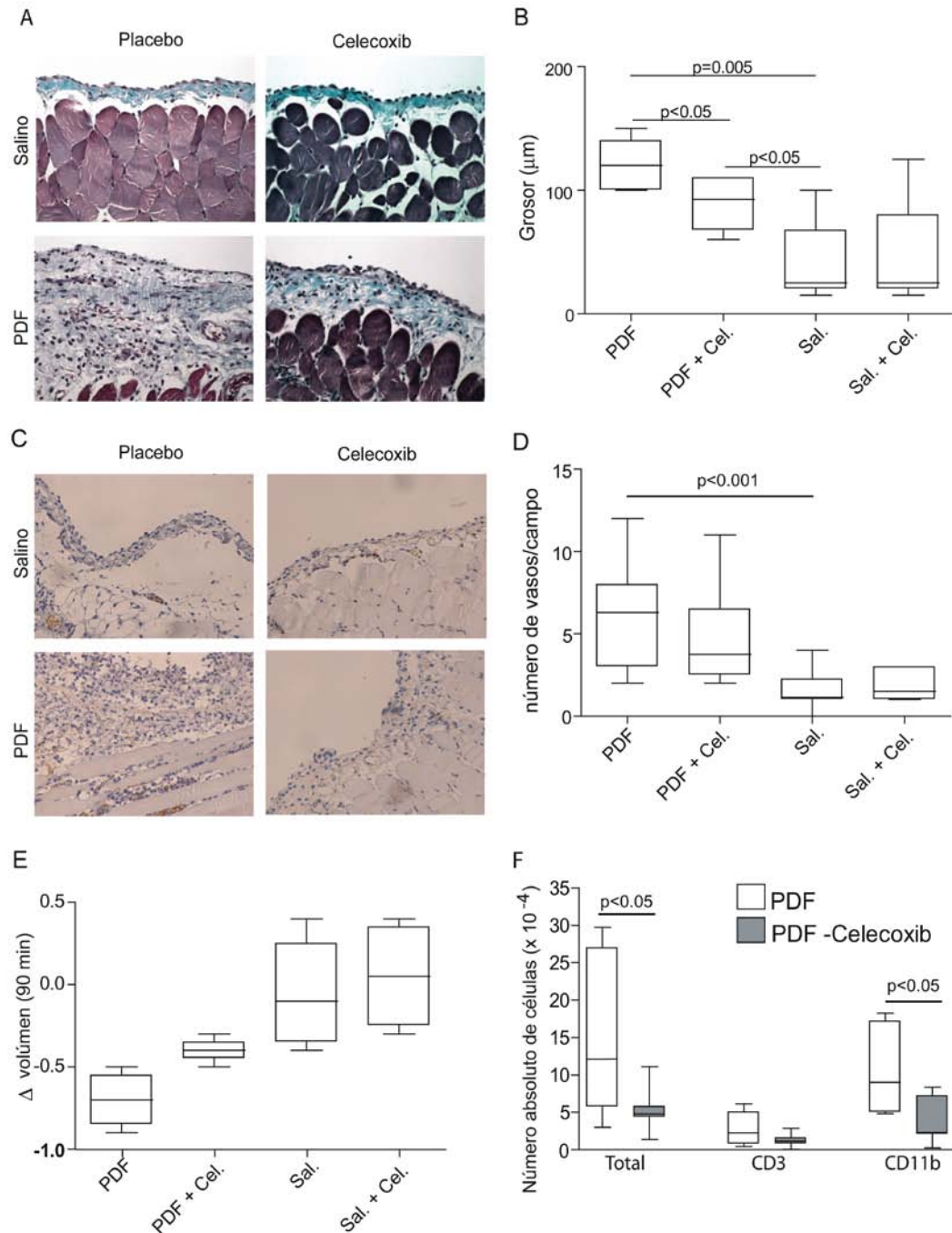


Figura 21. La inhibición de COX-2 disminuye el deterioro peritoneal inducido por la exposición a los líquidos de diálisis. (A y B) La exposición al líquido estándar resulta en un incremento de la deposición de la matriz extracelular (A) y grosor (B) de la membrana peritoneal. El tratamiento con celecoxib conlleva la reducción de estos efectos, como se puede ver en la tinción con tricrómico de masson. (C y D) El marcaje con CD31 de las muestras peritoneales revela que la exposición a líquido de diálisis induce angiogénesis y que el tratamiento con celecoxib no afecta el incremento en la formación de vasos. (E) El tratamiento con celecoxib mejora la función peritoneal (ultrafiltración) de los ratones tratados con líquido de diálisis. (F) El celecoxib reduce la inflamación de los ratones expuestos a líquido de diálisis. (De A a E) Los ratones reciben una instilación diaria de líquido de diálisis o salino durante 5 semanas. Después de ese periodo, las muestras fueron preparadas y analizadas como se describe en el apartado de material y métodos. (F) Para el estudio del efecto del celecoxib sobre la inflamación inducida por el líquido de diálisis, los ratones fueron expuestos al líquido de diálisis durante 15 días. Al final del experimento, las células drenadas fueron contabilizadas y analizadas por citometría de flujo. CD3^+ representa los linfocitos T y CD11b^+ la población mieloide. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, así como la mediana y valores máximos y mínimos.

6.2.6. La exposición a soluciones de diálisis bajas en PDGs provoca una menor inflamación y alteración estructural del peritoneo

Debido a que el cultivo de células mesoteliales, en presencia de líquidos de diálisis bajos en PDGs, presenta un escaso impacto en la TEM y en la expresión de COX-2, analizamos los daños ocasionados por estos en el modelo de ratón. Los ratones fueron instilados diariamente, a través del catéter, con líquido estándar o con un líquido más biocompatible (con una baja concentración en PDGs). La respuesta inflamatoria fue analizada a los 7 y 35 días de tratamiento. La fibrosis (medida como el engrosamiento de la membrana peritoneal) fue estudiada transcurridos 35 días. El análisis de las células inflamatorias recogidas en el efluente extraído de la cavidad peritoneal de los ratones, muestra como su número aumenta en los animales tratados con el líquido de diálisis estándar. Los ratones tratados con líquido pobre en PDGs, no experimentaron ningún cambio en el reclutamiento de células inflamatorias al peritoneo. El número de células encontradas en la cavidad peritoneal de los ratones, fue significativamente menor en el grupo de animales tratado con líquido de diálisis bajo en PDGs en el día 35 (figura 22 A). El porcentaje inicial de linfocitos T (CD3⁺) recolectados a día 7 se encontraba reducido de manera significativa, en el grupo tratado con el líquido biocompatible. Sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron en el día 35 (figura 22 B). Por otra parte, el reclutamiento de macrófagos (células CD11b⁺), mostró una reducción en el grupo de ratones tratado con el líquido pobre en PDGs a los 7 y 35 días. Estas diferencias, alcanzan la significación estadística en el análisis de los resultados obtenidos tras 35 días de tratamiento (figura 22 C). Los datos del grosor mesotelial indican que el grupo de animales tratado con líquido biocompatible, presenta una menor fibrosis, que el grupo de animales tratado con líquido de composición estándar (figura 22 D). Estos datos corroboran la hipótesis de que los PDGs poseen un gran papel en el deterioro peritoneal, inducido por el tratamiento de diálisis peritoneal.

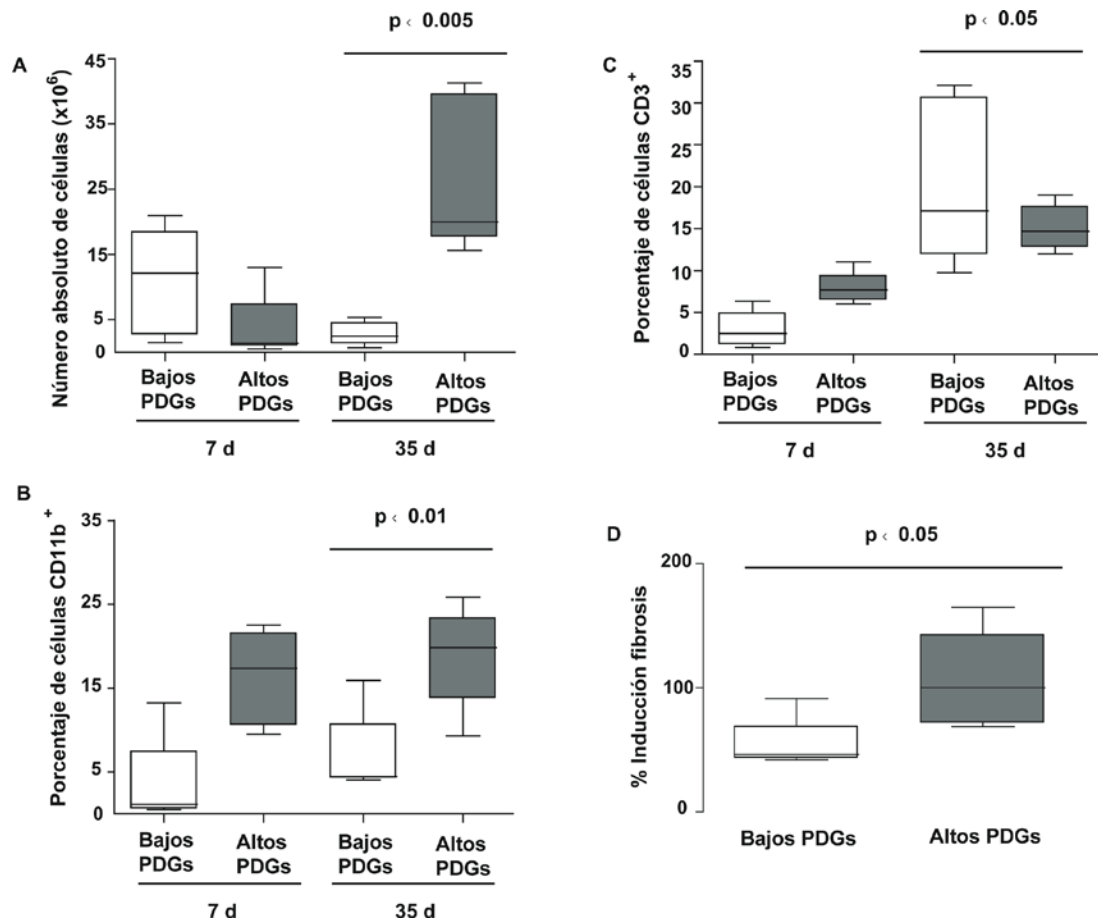


Figura 22. La exposición a las soluciones bajas en PDGs conlleva una reducción del deterioro peritoneal. Los ratones (11 por grupo) fueron instilados con 1.5 ml de una solución baja en PDGs (Bajos PDGs) o con un fluido estándar (Altos PDGs), ambos con 4.25% de glucosa. (A) Las células presentes en el efuente fueron analizadas por citometría de flujo al día 7 (cinco ratones por grupo) y al día 35 (6 ratones por grupo). (B y C) Los porcentajes de las células CD3⁺ (Linfocitos T) y CD11b⁺ (macrófagos) fueron también determinados mediante citometría de flujo en los días 7 y 35. (D) El grosor peritoneal fue medido a día 35, y se presenta como porcentaje de inducción de fibrosis siendo el 100%, la media del valor del grupo expuesto a fluidos con altos niveles de PDGs. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, la mediana y los valores máximos y mínimos.

6.3. Rosiglitazona

6.3.1. El tratamiento con rosiglitazona disminuye las alteraciones estructurales y funcionales inducidas por la exposición al líquido de diálisis en ratones

Los agonistas de PPAR- γ son capaces de disminuir los efectos de la glucosa y además poseen propiedades anti-inflamatorias (Bensinger *et al.*, 2008). Debido a ello, estudiamos si el uso de rosiglitazona, un antagonista de PPAR- γ , podría ser capaz de prevenir el deterioro de la membrana peritoneal en un modelo de ratón de exposición a líquido de diálisis. Los ratones fueron diariamente instilados, con un líquido de diálisis estándar (altas concentraciones de PDGs y lactato como tampón), mediante un catéter peritoneal instalado mediante cirugía. La rosiglitazona fue suministrada por vía oral, y el tratamiento duro un total de 3 semanas. Se emplearon animales que no fueron tratados de ningún modo como grupo control (control). Los ratones sometidos a cirugía se dividieron en tres grupos. Uno de ellos fue instilado diariamente con 1 ml de salino (salino), y sirvió como control del daño ocasionado por la cirugía, y por el efecto mecánico de la instilación de un líquido en la cavidad peritoneal. Los otros dos grupos fueron instilados con 2 ml de líquido de diálisis, siendo uno de ellos tratado, por vía oral de manera diaria, con rosiglitazona (grupos PDF y PDF + RSG).

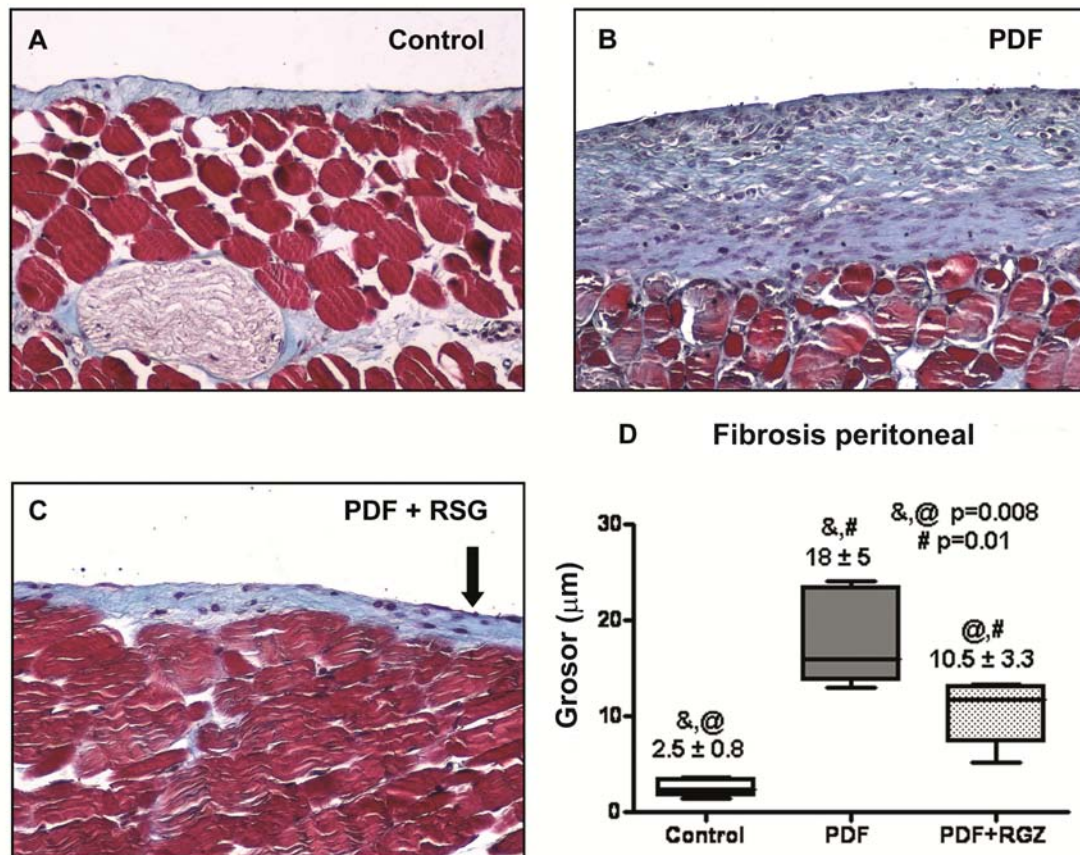


Figura 23. El tratamiento con rosiglitazona (RSG) decrece el engrosamiento peritoneal en un modelo de ratón. Los ratones reciben una instilación diaria durante 3 semanas con o sin la administración oral de rosiglitazona (20 mg/Kg/día: PDF, n=12 y PDF + RSG, n=11). Un grupo control de ratones que no fueron operados fueron también incluidos (control; n=5). Las muestras peritoneales fueron preparadas y analizadas como se describe en la sección de material y métodos. (A-C) El líquido de diálisis estándar incrementa la deposición de matriz extracelular y el grosor de la membrana peritoneal, mientras que la administración de rosiglitazona reduce estos efectos, como puede observarse en las tinciones de tricrómico de masson (fotos representativas). La flecha en el panel c muestra la preservación del mesotelio en un animal tratado con RSG. (D) Las cajas representan los percentiles 25 y 75, la mediana, el mínimo y los valores máximos. Los números sobre las cajas indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos. Aumento de 200 x.

El análisis histológico de las biopsias tomadas del peritoneo parietal de los ratones, muestra que el tratamiento con líquido de diálisis causa una pérdida en la monocapa de células mesoteliales, así como un incremento en el engrosamiento de la zona submesotelial, en comparación con lo visto en las muestras de ambos grupos control (figura 23). La administración de rosiglitazona, a los ratones tratados con líquido de diálisis, redujo significativamente la fibrosis peritoneal y mejoro la preservación del mesotelio (figura 23 D). Para observar los cambios ocasionados por los tratamientos en la angiogénesis, se efectuó una tinción con un anticuerpo anti-CD31 en cortes de peritoneo parietal. El tratamiento con líquido de diálisis provoco un aumento significativo en el número de vasos del peritoneo parietal, en comparación con

el grupo control y con el grupo tratado con salino (figura 24). Otro cambio histológico característico de la membrana peritoneal durante el tratamiento con líquido de diálisis, es la acumulación de miofibroblastos (células α -SMA positivas) en la zona compacta. Estos pueden derivar de la activación de fibroblastos residentes, o de la conversión local de las células mesoteliales vía TEM (Aroeira et al., 2007; Jimenez-Heffernan et al., 2004). En el peritoneo de los ratones control, no se encuentra expresión de α -SMA, salvo en las células de músculo liso o en las paredes de los vasos, como se aprecia en la figura 25. También se analizó la expresión del marcador mesotelial citoqueratina. Las imágenes muestran que en los ratones del grupo control, la expresión de citoqueratina esta limitada a la monocapa de células mesoteliales (figura 25 A y B). Por el contrario, se pueden observar miofibroblastos en la zona compacta submesotelial, de los ratones tratados con líquido de diálisis (figura 25 C). Un dato remarcable es la tendencia de los miofibroblastos a agruparse mayoritariamente cerca de la superficie mesotelial. En las muestras que presentan una mayor fibrosis, los miofibroblastos también se encuentran en zonas profundas de la zona compacta (Figura 25 C). En algunas de estas agrupaciones, los miofibroblastos co-expresan citoqueratina, indicando que estas células proceden de un origen mesotelial (figura 25 D). Interesantemente, los ratones tratados con líquido de diálisis y rosiglitazona, muestran una disminución submesotelial de α -SMA. Además, se observa como en estos animales, la citoqueratina está expresada casi exclusivamente en la membrana mesotelial (figuras 25 E y F).

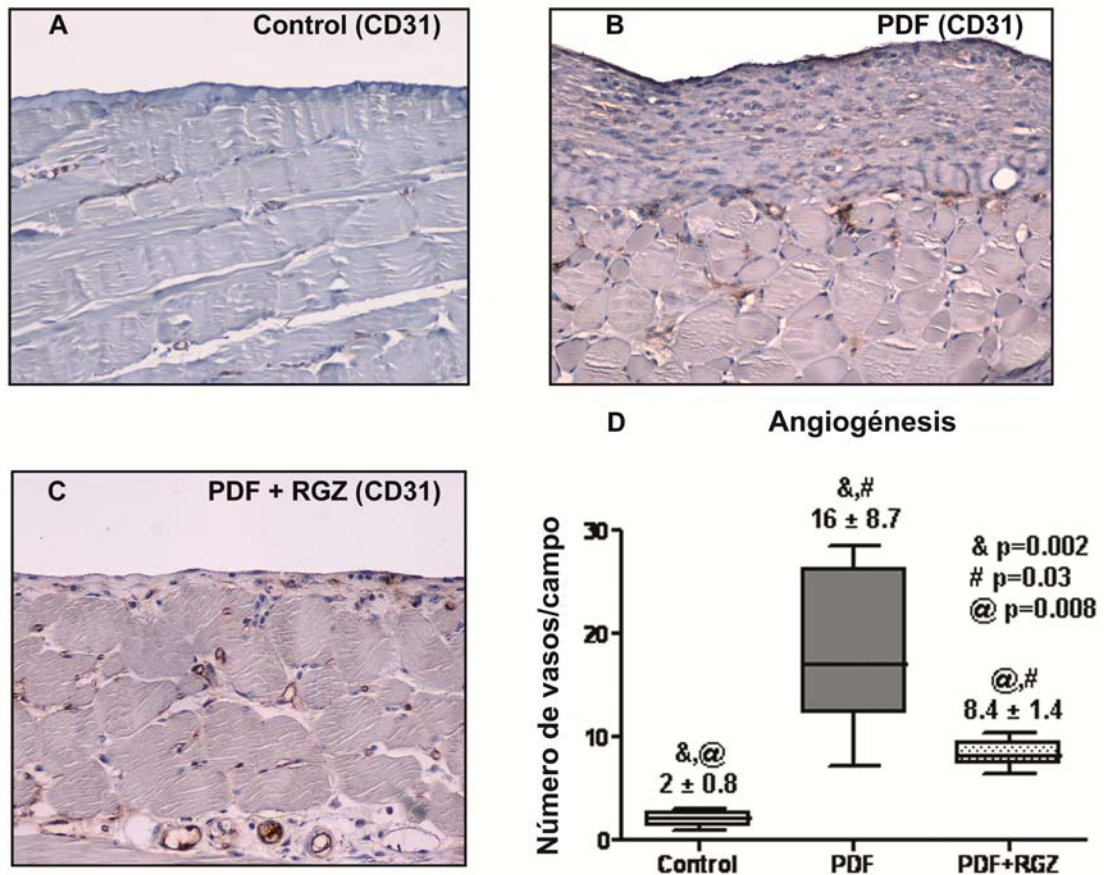


Figura 24. El tratamiento con rosiglitazona decrece la angiogénesis inducida por el líquido de diálisis en el peritoneo parietal. Los ratones reciben una instilación diaria de fluido estándar durante 3 semanas con o sin administración oral de rosiglitazona (PDF, n=12 y PDF+RSG, n=11). Un grupo control de ratones no sometidos a cirugía fue incluido (control, n=5). (A-C) La exposición a líquidos estándar incrementa la angiogénesis peritoneal. El tratamiento con rosiglitazona reduce de manera significativa el número de vasos, determinado por el marcaje de CD31 (fotos representativas). (D) Las cajas indican los percentiles 25 y 75, la mediana y los valores máximo y mínimo. Los números encima de las cajas representan la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos. Aumento 200 x.

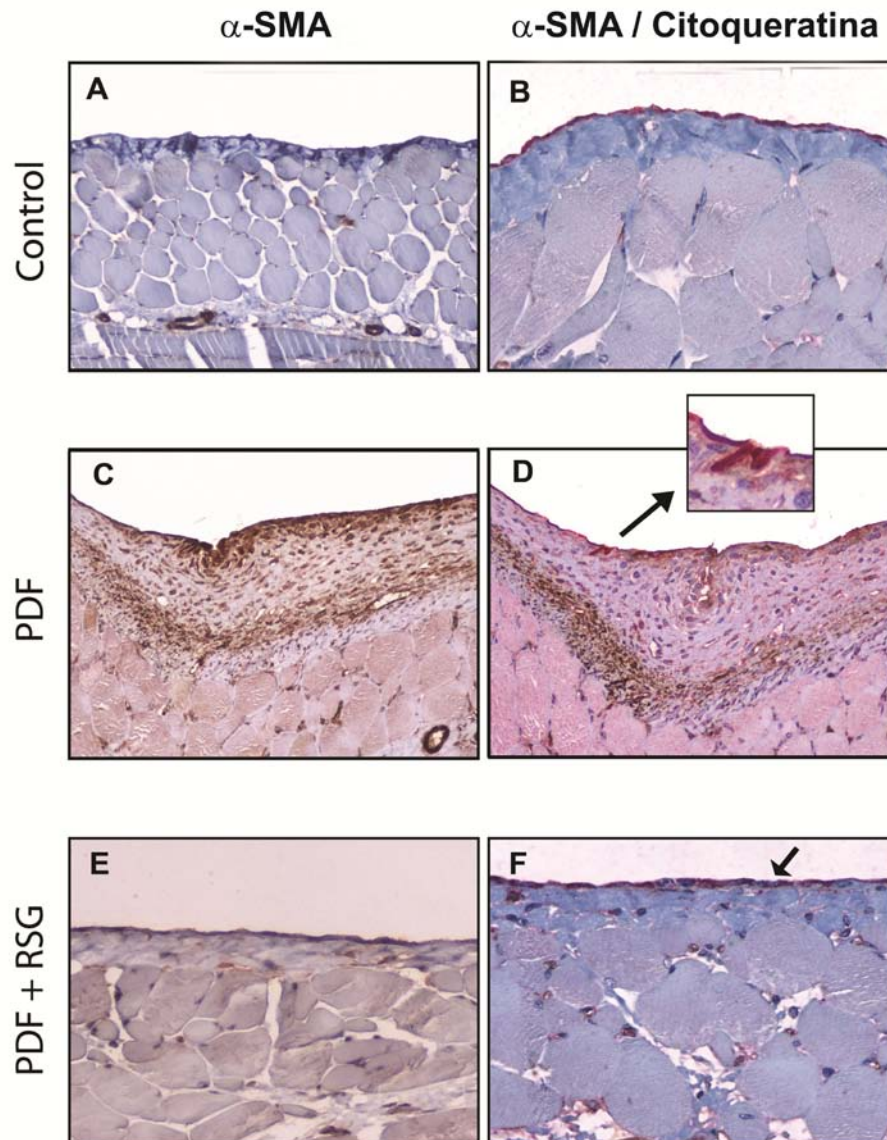


Figura 25. Los efectos de la rosiglitazona en la expresión submesotelial de α -SMA y sobre la TEM de las células mesoteliales *in vivo*. (A, C y E) La tinción con anti- α -SMA muestra que no hay expresión en el peritoneo parietal de los ratones pertenecientes al grupo control, salvo en las células del músculo liso o en las paredes de los vasos (A). En los ratones tratados con líquido de diálisis, los miofibroblastos están presentes, tendiendo a aparecer en la zona compacta submesotelial. (C). Los ratones instilados con líquido de diálisis, tratados con rosiglitazona, poseen una expresión más tenue de α -SMA (e). (B, D y F) La tinción doble con anti- α -SMA (marrón) y anti-citoqueratina (rojo) muestra que en los ratones control la expresión de citoqueratina se encuentra limitada al mesotelio (B). En los ratones tratados con líquido de diálisis, la mayoría de miofibroblastos que aparecen en la zona superior, co-expresan citoqueratina, indicativa de su origen mesotelial (D). En los ratones tratados con líquido de diálisis y rosiglitazona, la expresión de citoqueratina, se encuentra prácticamente reducida al mesotelio (F). La figura inserta en el panel d, muestra en detalle la co-expresión de α -SMA y citoqueratina, invadiendo el espacio submesotelial. La flecha en el panel f, indica el mesotelio preservado en los animales tratados con rosiglitazona. Aumento 200 x.

Para analizar el funcionamiento del peritoneo, se realizó un PET test en el último día de tratamiento, como paso previo al sacrificio del animal. Esta prueba fue realizada en los grupos salino, PDF y PDF + RSG. Para ello, se instilo 1.5 ml de la solución de diálisis en el interior de la cavidad peritoneal de

los ratones, por medio del catéter, y 30 minutos después se recolectó el líquido presente en la cavidad peritoneal de los ratones. Además, se recolectaron muestras sanguíneas por medio de una punción cardiaca. Como se muestra en la figura 26 A, los volúmenes recuperados en los animales expuestos a líquidos de diálisis son significativamente inferiores a aquellos tratados con salino, indicando un deterioro en la función dialítica peritoneal. El tratamiento con rosiglitazona supuso un aumento significativo de los volúmenes recogidos, por lo tanto una mejora en el funcionamiento de la membrana. Debido a que los agonistas de PPAR- γ son capaces de disminuir los efectos de la glucosa, medimos los niveles de ésta en el suero sanguíneo de los ratones empleados para el experimento. Los resultados indican un aumento de glucosa en los ratones expuestos al líquido de diálisis, en comparación con el grupo salino. Como era de esperar, los animales tratados con rosiglitazona mostraron una parcial normalización en los niveles de glucosa (figura 26 B). Estos resultados demuestran que la rosiglitazona es capaz de impedir algunos de los efectos perjudiciales inducidos por la exposición al líquido de diálisis. Los resultados obtenidos en este estudio revelan que el tratamiento con rosiglitazona es capaz de reducir la fibrosis y la angiogénesis así como lograr una mejora en la función de la membrana peritoneal.

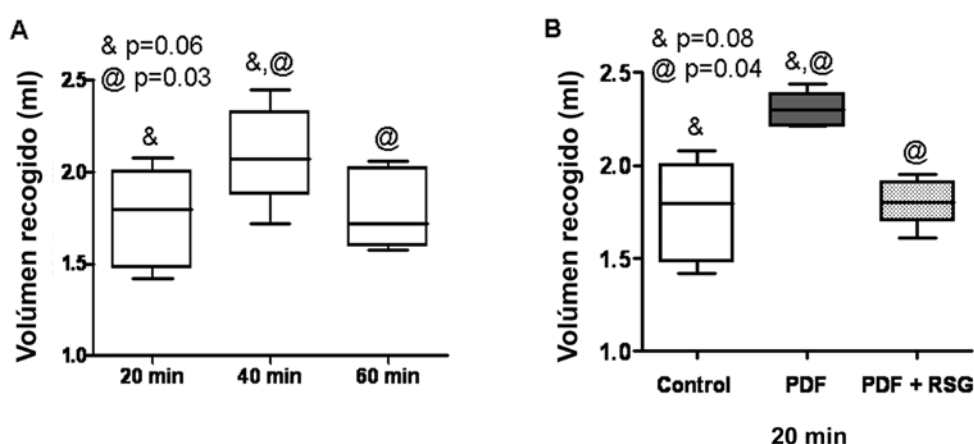


Figura 26. El tratamiento con rosiglitazona mejora la ultrafiltración peritoneal y reduce la concentración de la glucosa en suero. Se realizó un PET test de 30 minutos el último día de tratamiento. (A) Los volúmenes recuperados en los animales tratados con líquido de diálisis, son más bajos que aquellos recuperados en los animales instilados con salino. Los ratones tratados con rosiglitazona mostraron una recuperación de los volúmenes de ultrafiltración. (B) Las concentraciones de glucosa en el suero son mayores en los animales expuestos a líquido de diálisis, en comparación con los expuestos a salino. En los animales tratados con rosiglitazona, se observó una normalización parcial de los niveles de glucosa. Los gráficos de cajas representan los percentiles 25 y 75, mediana y valores máximo y mínimo. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos.

6.3.2. Efectos del tratamiento con rosiglitazona en la acumulación de AGEs y en la inflamación inducida por la exposición a líquidos de diálisis en ratones

La acumulación en el peritoneo de AGEs, así como la inflamación temprana, son efectos secundarios que aparecen en los primeros momentos del tratamiento con los líquidos de diálisis. Ambos pueden inducir la TEM de las células mesoteliales, la acumulación de componentes de matriz extracelular, angiogénesis y la disfunción de la membrana peritoneal (Aroeira *et al.*, 2007). Utilizamos una tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-AGEs, para conocer el efecto del tratamiento con rosiglitazona sobre la acumulación de estos derivados de la glucosa. Como era de esperar, los animales tratados con el líquido de diálisis presentan acumulación de AGEs en su peritoneo parietal, siendo de manera más intensa, en la zona compacta submesotelial. Los datos obtenidos muestran que el tratamiento con rosiglitazona, logro una reducción significativa en la acumulación de estas moléculas perjudiciales (figura 27). También se estudio el proceso inflamatorio en el peritoneo parietal de los animales analizados. Para conocer el efecto de la rosiglitazona sobre el reclutamiento de leucocitos, se realizo una tinción con anticuerpo anti-CD45. Los resultados muestran un aumento en el número de leucocitos encontrados en el peritoneo parietal de los animales tratados con líquidos de diálisis, en comparación con el grupo control y salino. Esta diferencia no resulta alcanzar la significación estadística. Sorprendentemente, el tratamiento con rosiglitazona, lejos de disminuir esta población celular, ha logrado aumentar el número de estas células, presentes en las biopsias de peritoneo parietal (figura 28). También se analizó la inflamación a través del estudio de las poblaciones celulares, presentes en el efluente peritoneal recogido durante el PET test, así como la concentración de diversas citoquinas presentes en este líquido. Los resultados del análisis de los leucocitos también concluyen un aumento significativo del número total de células recolectadas en el grupo de animales tratados con rosiglitazona, en comparación con aquellos tratados solamente con líquido de diálisis (figura 29 A). El incremento en células del efluente fue más evidente en el caso de las células T (CD3⁺), y en el de los dos tipos de linfocitos, CD4⁺ y CD8⁺, aumentando estos de un modo significativo (figura 29

B-D). En contraste, el incremento en linfocitos B (CD19⁺) y macrófagos (F4/80⁺), no alcanzo la significación estadística (figura 29 E y F).

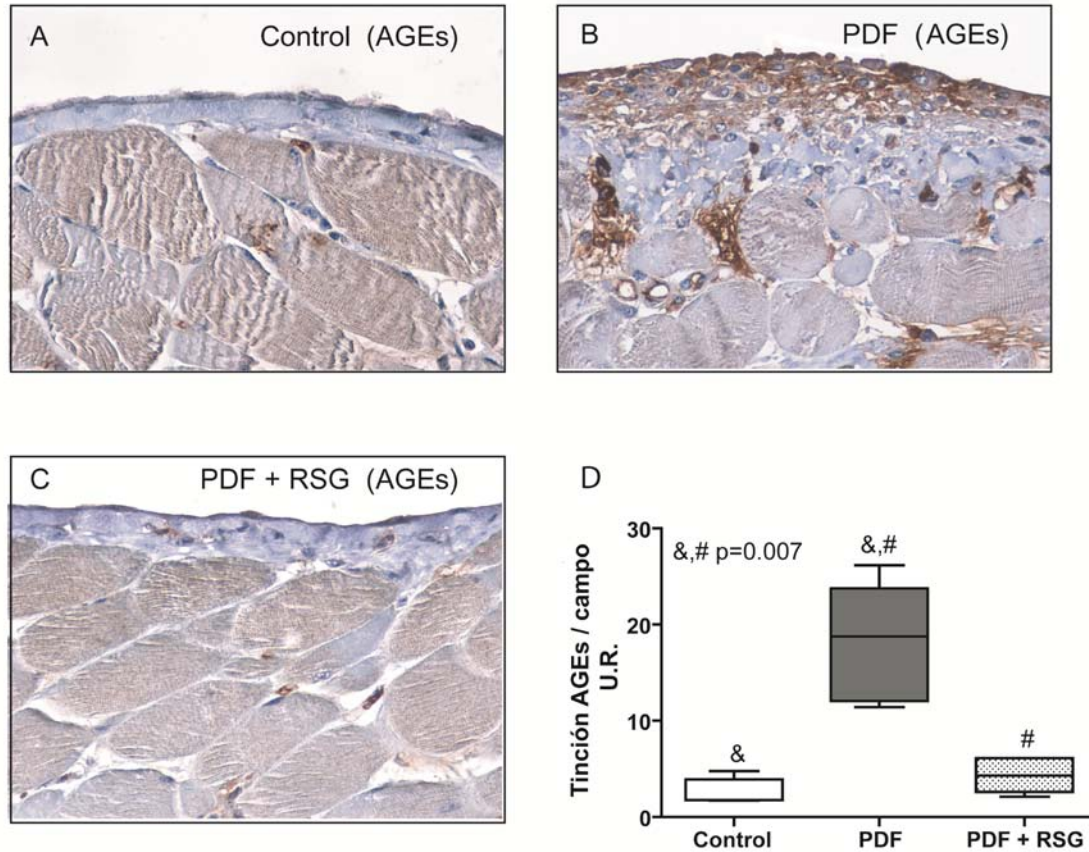


Figura 27. El tratamiento con rosiglitazona disminuye la acumulación de AGEs inducida por el líquido de diálisis. Los ratones recibieron una instilación diaria de líquido de diálisis durante 3 semanas con o sin administración oral de rosiglitazona (PDF, n=12 y PDF+RSG n=11). Un grupo control de ratones que no se sometieron a ninguna manipulación, fueron usados como grupo control (control; n=5). (A-C) La exposición a líquido de diálisis resulto en la acumulación de AGEs en el peritoneo parietal. El tratamiento con rosiglitazona reduce significativamente esta acumulación (imágenes representativas). (D) Los gráficos de cajas representan los percentiles 25 y 75, mediana y valores máximo y mínimo. Los números superiores indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos.

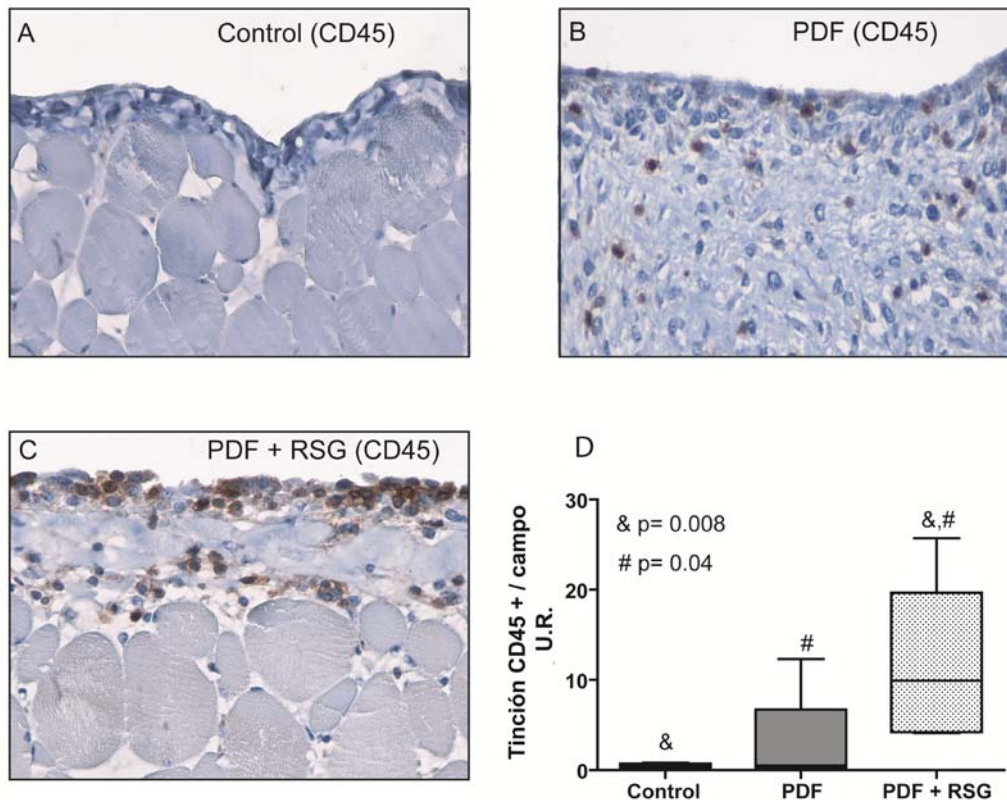


Figura 28. Efecto del tratamiento con rosiglitazona sobre el reclutamiento de células CD45. Los ratones recibieron una instilación diaria de líquido de diálisis durante 3 semanas con o sin administración oral de rosiglitazona (PDF, n=12 y PDF+RSG n=11). Un grupo control de ratones que no se sometieron a ninguna manipulación fueron usados como grupo control (control; n=5). (A-C) La infiltración de leucocitos aumenta en los ratones tratados con líquido de diálisis en comparación con aquellos tratados con salino, aunque sin alcanzar la significación estadística. La administración de rosiglitazona aumenta de manera significativa el reclutamiento de células CD45. (D) Los gráficos de cajas representan los percentiles 25 y 75, mediana y valores máximo y mínimo. Los números superiores indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos.

Interesantemente, los efluentes de los ratones tratados con rosiglitazona, presentan una mayor concentración de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, en comparación con los ratones solamente tratados con líquido de diálisis (figura 30 A). Estos datos sugieren que la administración de rosiglitazona modula la inflamación, probablemente mediante el aumento de las células T reguladoras. Para responder a si el tratamiento con rosiglitazona puede haber afectado a la población peritoneal de las células T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, encontrada en los efluentes, se realizó un análisis por citometría de flujo midiendo dichos marcadores. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en la población de células T, encontrada en los efluentes peritoneales de los animales tratados con rosiglitazona, en comparación con aquellos tratados solamente con líquido de diálisis (figura 30 B y C). Estos resultados en conjunto, sugieren que la administración de rosiglitazona disminuye los efectos

perjudiciales inducidos por la exposición al líquido de diálisis. Los factores causantes parecen ser la reducción de los AGEs, así como la inducción de una respuesta de las células T reguladoras, que provoca una modulación de la inflamación.

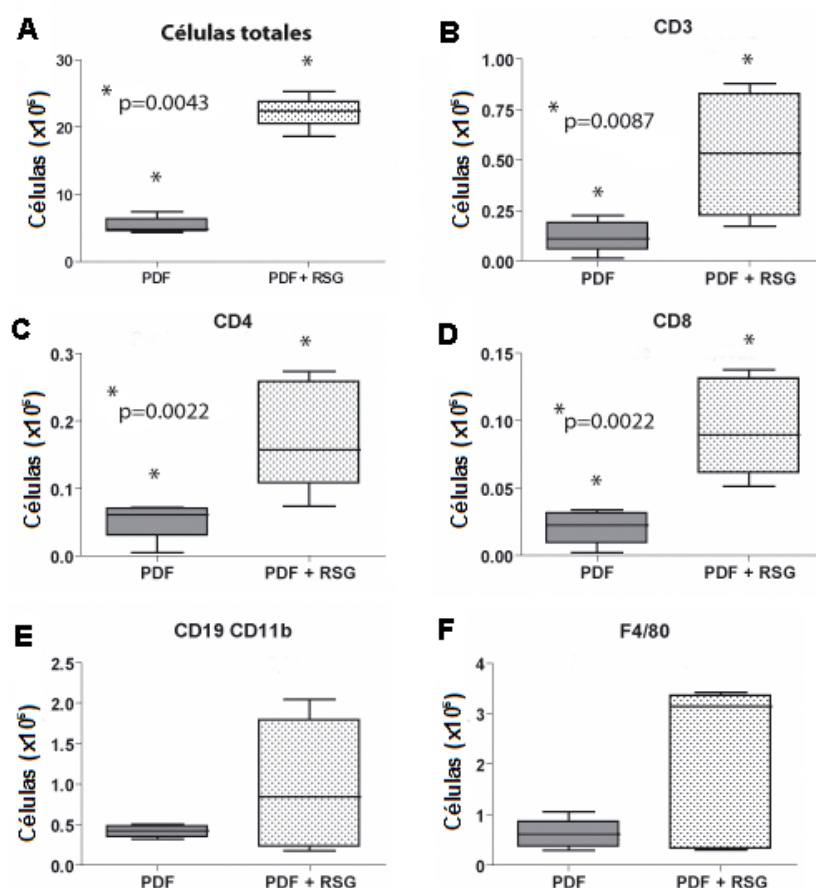


Figura 29. Efecto del tratamiento de rosiglitazona sobre el reclutamiento de leucocitos. (a) El análisis de los leucocitos en el volumen drenado muestra que el tratamiento con rosiglitazona ha causado un incremento del número total de células reclutadas. (b-d) El incremento en número alcanza la significación para el total de células T (CD3⁺), así como para las poblaciones de linfocitos-T CD4⁺ y CD8⁺. (e y f) El incremento en linfocitos-B (CD19⁺) y macrófagos (F4/80⁺) no resultó ser estadísticamente significativo. Los gráficos de cajas representan los percentiles 25 y 75, mediana y valores máximo y mínimo. Los números superiores indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos.

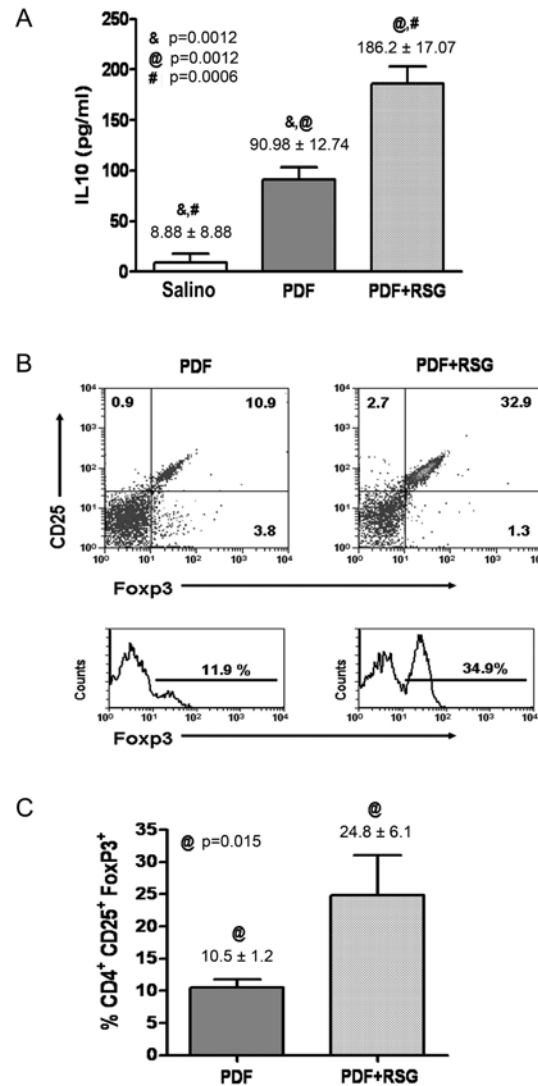


Figura 30. El tratamiento con rosiglitazona induce la producción de IL-10 e incrementa la población de células T reguladoras en la cavidad peritoneal. (A) La concentración de IL-10 medida en el efluente de los ratones es mayor en aquellos tratados con líquido de diálisis en comparación con aquellos tratados con salino. La administración de rosiglitazona de los animales tratados con líquidos de diálisis aumenta todavía más la concentración de dicha citoquina, alcanzando la significación estadística con respecto a los otros grupos. Las gráficas de barras representan la media \pm error estándar. Los símbolos representan la significación estadística entre grupos. (B) Citometría de flujo de la expresión total de CD25 y FoxP3, en la población de células T CD4⁺, aisladas del efluente peritoneal de los ratones expuestos a líquidos de diálisis tratados o no con rosiglitazona. Los números se corresponden con las proporciones de células CD25⁺ y/o FoxP3⁺ en cada panel (panel superior). Los histogramas representan los porcentajes totales de las células FoxP3⁺ en cada caso (panel inferior). Se muestra el análisis de un ratón representativo de cada grupo. (C) Proporciones de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ en ratones instilados con líquido de diálisis, tratados o no con rosiglitazona. Las barras representan la media \pm error estándar.

6.3.3. Efectos *in vitro* de la rosiglitazona sobre la TEM y la muerte celular

La TEM de las células mesoteliales es un proceso importante en la disfunción de la membrana peritoneal y el tratamiento con rosiglitazona resulta en una disminución de las células mesoteliales transdiferenciadas a fenotipo

fibroblástico en la zona compacta (figura 25). Por lo tanto, examinamos el efecto *in vitro* de rosiglitazona, en la TEM inducida por la citoquina TGF- β 1, sobre cultivos de células mesoteliales extraídas de epiplón de pacientes no urémicos. En primer lugar, se constató que dichas células expresan PPAR- γ y se estudió si su expresión se ve afectada por cambios en la concentración de TGF- β 1 y o de rosiglitazona. Los resultados muestran que las células mesoteliales presentan niveles elevados de PPAR- γ . Su expresión se ve disminuida por la exposición a rosiglitazona de un modo dosis-dependiente (0.1-10mM), sugiriendo una regulación con realimentación negativa de su receptor (figura 31 A). El TGF- β 1 induce la expresión de PPAR- γ en las células mesoteliales expuestas a diferentes dosis de rosiglitazona (figura 31 A). También se estudio si la rosiglitazona es capaz de impedir la TEM causada por TGF- β 1 en condiciones *in vitro*. Se observó que la rosiglitazona no previene los cambios morfológicos inducidos por el TGF- β 1 o la bajada de expresión de E-cadherina (figura 31 B y C). Además, la rosiglitazona no afectó el aumento de expresión de las moléculas asociadas con el proceso de TEM, incluyendo α -SMA así como a los componentes de matriz, colágeno I y fibronectina (figura 31 C). Tampoco logro disminuir la expresión del factor pro-angiogénico VEGF (figura 31 E), ni la molécula pro-inflamatoria COX-2 (figura 31 D).

También se estudió el efecto de la rosiglitazona sobre células mesoteliales que habían sufrido TEM. En concreto, se expuso a células mesoteliales con fenotipo no-epitelioide, extraídas de efluentes de pacientes en diálisis peritoneal, a diversas concentraciones de rosiglitazona. Los resultados muestran como dicho tratamiento, fue incapaz de revertir las características mesenquimales de dichas células (figura 32). Estos resultados sugieren, que la señalización por medio de PPAR- γ no esta directamente implicada en la TEM de las células mesoteliales.

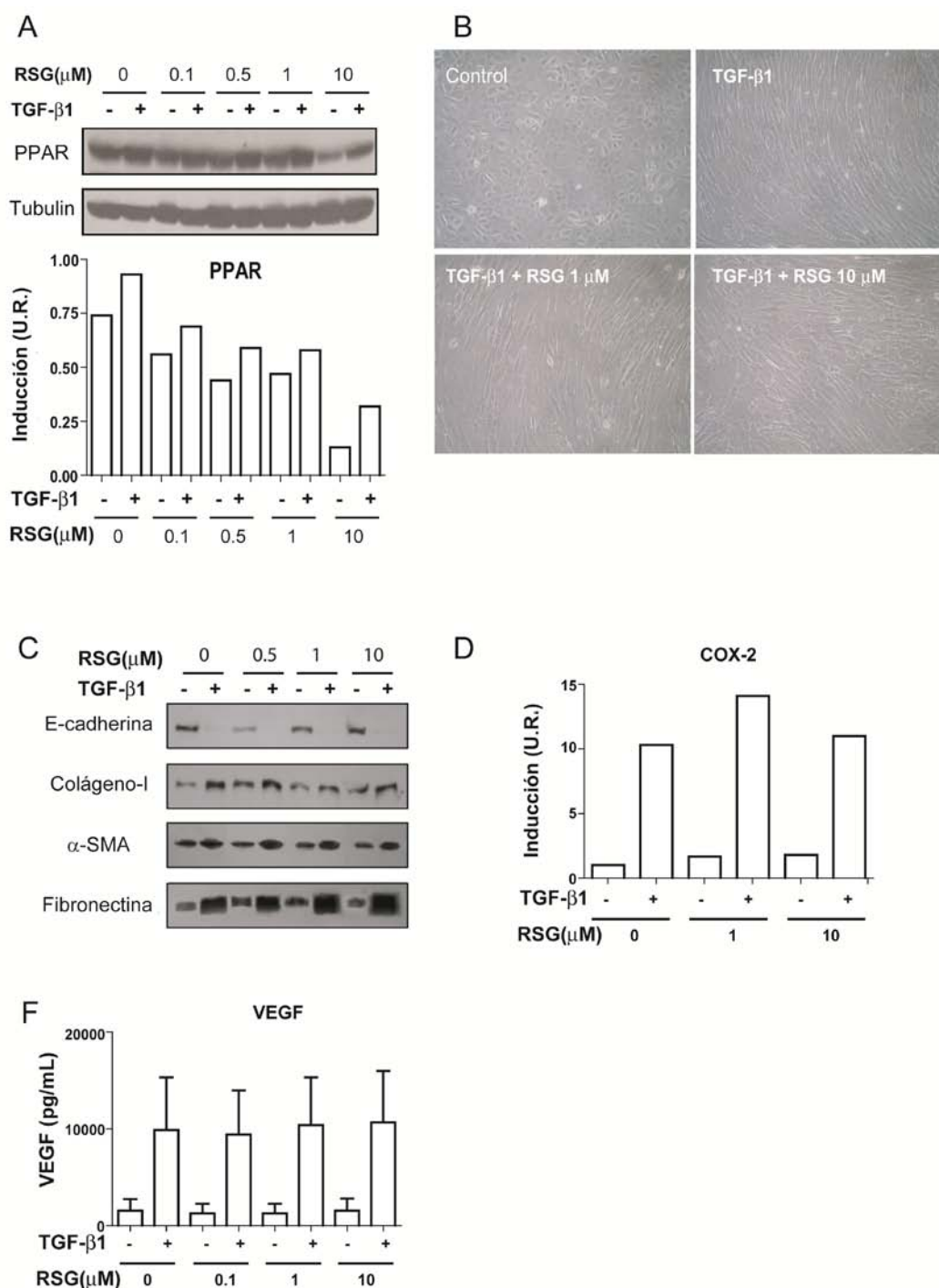


Figura 31. El tratamiento con rosiglitazona no afecta la TEM in vitro de las células mesoteliales inducida por TGF- β 1. Se utilizaron células mesoteliales derivadas de epiplón, se trataron con TGF- β 1 durante 48 horas en presencia o no de diferentes dosis de rosiglitazona (0.1–10mM). (A) El análisis de western blot, muestra que las células mesoteliales expresan altos niveles de PPAR- γ y que su expresión baja de una manera dosis-dependiente por la exposición a rosiglitazona. La exposición a TGF- β 1 induce la expresión de PPAR- γ en las células mesoteliales tratadas con diferentes dosis de rosiglitazona. (B) Las imágenes obtenidas mediante un microscopio de contraste de fase, demuestran que el tratamiento con rosiglitazona (1 y 10 mM) no es capaz de prevenir la adquisición del fenotipo no-epitelioide de las células mesoteliales. (C) El análisis mediante western blot muestra que el tratamiento con rosiglitazona (0.5, 1 y 10 mM) no es capaz de prevenir la bajada de expresión de E-cadherina. Tampoco es capaz de afectar la subida de expresión de moléculas asociadas a TEM como α -SMA, colágeno I y fibronectina. (D) Mediante RT-PCR, se observó que el tratamiento con rosiglitazona (1 y 10mM) no es capaz de bloquear la inducción de la molécula pro-inflamatoria Cox-2. (E) El tratamiento con rosiglitazona (0.1, 1 y 10 mM) no afecta a la subida de expresión del factor pro-angiogénico VEGF, dato observado mediante ELISA. Las barras en el panel D indican experimentos representativos. En el panel E indican la media \pm desviación estándar de un total de tres experimentos.

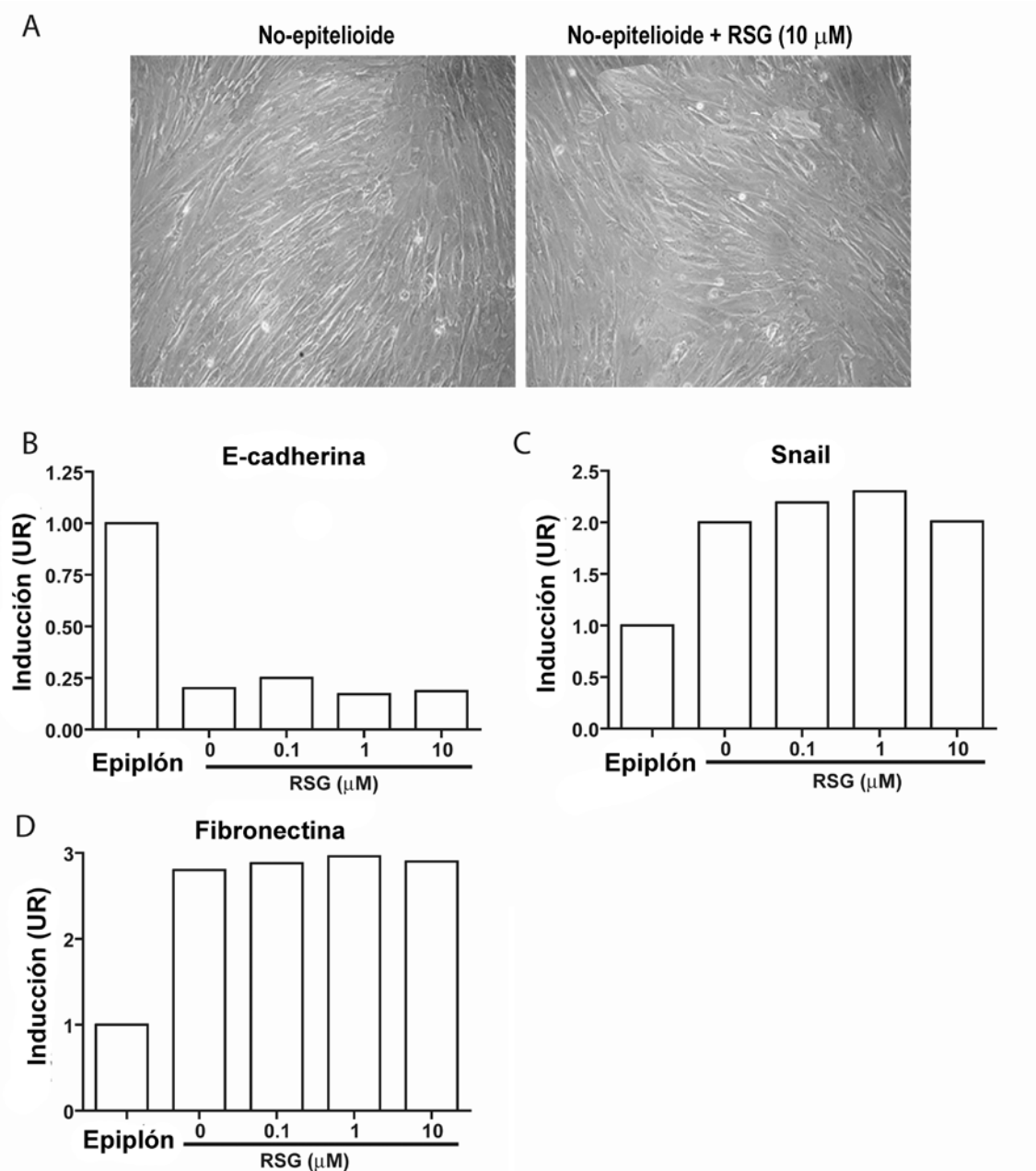


Figura 32. El tratamiento con rosiglitazona no afecta la TEM ex vivo de las células mesoteliales con fenotipo fibroblástico, extraídas de efluente. Se utilizaron células mesoteliales, con fenotipo fibroblástico, extraídas de pacientes en diálisis peritoneal. Se trataron con varias dosis de rosiglitazona (0.1–10mM) durante 48 horas. (A) Las imágenes de microscopio de campo claro muestran que el tratamiento no logra revertir el fenotipo fibroblástico. Aumento 200 x. (B-D) El análisis mediante RT-PCR muestra que el tratamiento con rosiglitazona no afecta a la expresión de E-cadherina (B), Snail (C) y fibronectina (D).

Los agonistas de PPAR- γ son reguladores clave de la supervivencia y proliferación celular, y a ellos se les atribuyen funciones pro y anti-apoptóticas. Debido a que observamos una mejor conservación de la monocapa de células mesoteliales en los ratones administrados con rosiglitazona (figuras 23 y 25), analizamos el papel del agonista de PPAR- γ en el crecimiento celular y

apoptosis en condiciones *in vitro*. El tratamiento de las células mesoteliales, derivadas de epiplón, con diferentes dosis de rosiglitazona, no parece afectar el ciclo celular (tabla 9) o la capacidad de cierre de herida (“wound healing”) de las células (figura 33). Sin embargo, cuando las células mesoteliales fueron sometidas a dos estímulos pro-apotóticos (100nM de estaurosporina o líquido de diálisis con alto contenido en PDGs), la rosiglitazona ejerció un efecto protector sobre la muerte celular (figura 34). Estos resultados indican que la rosiglitazona no es citotóxica para las células mesoteliales, sino que posee un efecto anti-apoptótico sobre este tipo celular.

	M1		M2		M3		M4	
FSB %	0	20	0	20	0	20	0	20
CONTROL	0.18	0.13	81.73	77.68	3.3	7.25	14.84	15
RSG 1 μ M	0.19	0.11	83.18	81.27	3.03	4.78	13.67	14
RSG 10 μ M	0.14	0.1	84.97	80.01	3.05	5.81	12	13.3
RSG 100 μ M	0.79	0.11	82.33	78.8	2.51	9.2	14.46	12.4

Tabla 9. Efectos de la rosiglitazona sobre el ciclo celular de las células mesoteliales. Los resultados están expresados en %.

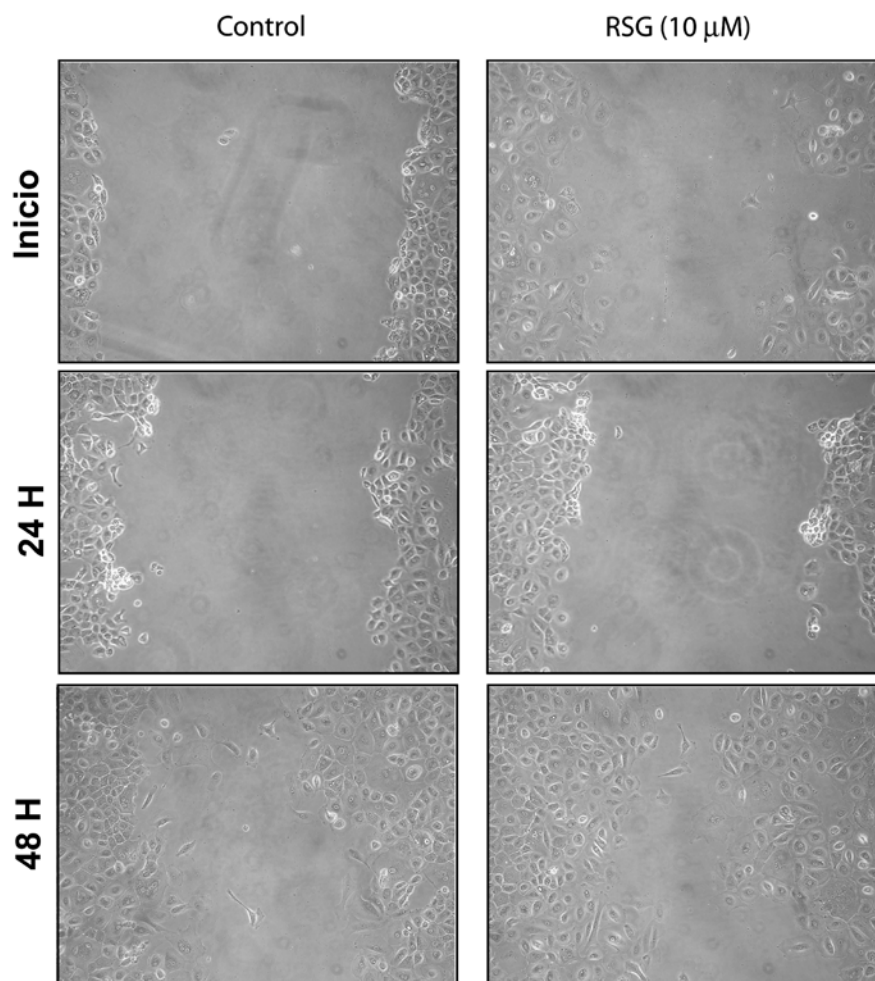


Figura 33. La rosiglitazona no afecta al experimento de cierre de herida ("wound healing"). Células mesoteliales en confluencia, fueron sometidas a un daño mecánico. Las imágenes de la izquierda se corresponden con el tratamiento con rosiglitazona (10 μ M), las de la derecha son el cultivo control. Aumento 200 x.

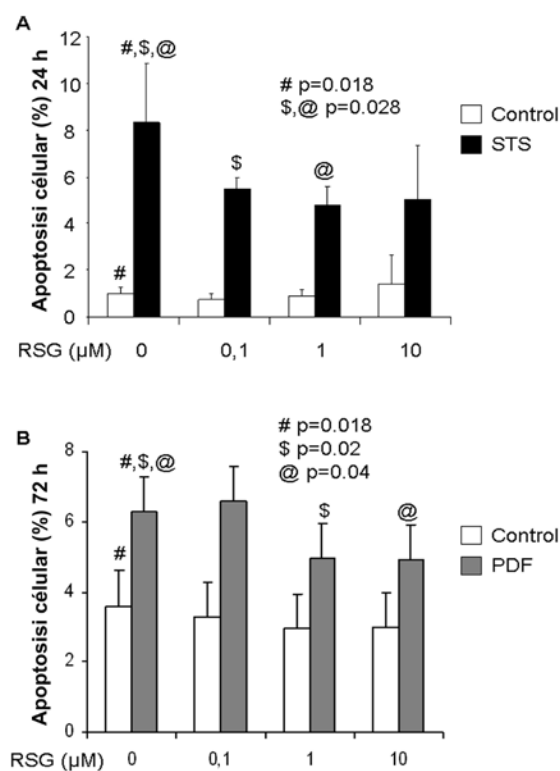


Figura 34. Efectos de la RSG sobre la apoptosis in vitro de las células mesoteliales. Las células mesoteliales extraídas de epiplón, fueron cultivadas hasta la subconfluencia. Se cultivaron en un medio libre de suero durante 24 horas para su posterior tratamiento con dos estímulos apoptóticos, la estaurosporina (STS) y líquido de diálisis estándar en ausencia o no de rosíglitazona (0.1, 1 y 10 mM). El análisis del contenido mediante citometría de flujo revela que el tratamiento con rosíglitazona es capaz de disminuir la apoptosis mediada por el tratamiento con 100nM de estaurosporina durante 24 horas (a) y de las células expuestas al líquido de diálisis (4.25% glucosa, stay safe; Fresenius) durante 72 horas (b). Las barras indican media \pm desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. Los símbolos representan las diferencias estadísticas.

6.4. Péptidos anti-TGFβ1 (P17 y P144)

6.4.1. El péptido bloqueante de TGF-β1 P17, contrarresta la TEM inducida por TGF-β1 y por efluente de peritonitis, en condiciones *in vitro*

En primer lugar analizamos el efecto del péptido bloqueante de TGF-β1 en la TEM *in vitro* de las células mesoteliales. El tratamiento de células mesoteliales derivadas de epiplón con TGF-β1 y un péptido control, induce la fosforilación de Smad 2/3 y la expresión de Snail a tiempos tempranos, así como la bajada de expresión de E-cadherina a las 24 horas. Estos efectos son prevenidos mediante el co-tratamiento con el péptido bloqueante de TGF-β1, P17 (figura 35 A y B). Además, el péptido P17 es capaz de bloquear por completo la subida de expresión de los marcadores mesenquimales, colágeno I y fibronectina, a 72 horas (figura 35 B). Este experimento sirvió para comprobar el buen funcionamiento del péptido P17 como bloqueante de TGF-β1 en condiciones *in vitro*.

En el ambiente peritoneal, expuesto a líquido de diálisis, existen una gran cantidad de citoquinas de diversos tipos. Para conocer el papel del TGF-β1 dentro de este conjunto, en condiciones *in vitro*, dispusimos un experimento en el cual se expuso a células mesoteliales, extraídas de epiplón, a efluente peritoneal de pacientes en diálisis que sufrían peritonitis. Este líquido presenta una gran cantidad de diversas citoquinas a altas concentraciones. El resultado es que el bloqueo de TGF-β1, por parte del péptido P17, es capaz de impedir la TEM de las células mesoteliales, así como la expresión de diversas moléculas asociadas a ésta. Estos resultados indican que el TGF-β1 presenta un papel principal, dentro del conjunto de las citoquinas, generado en el contexto de la inflamación peritoneal.

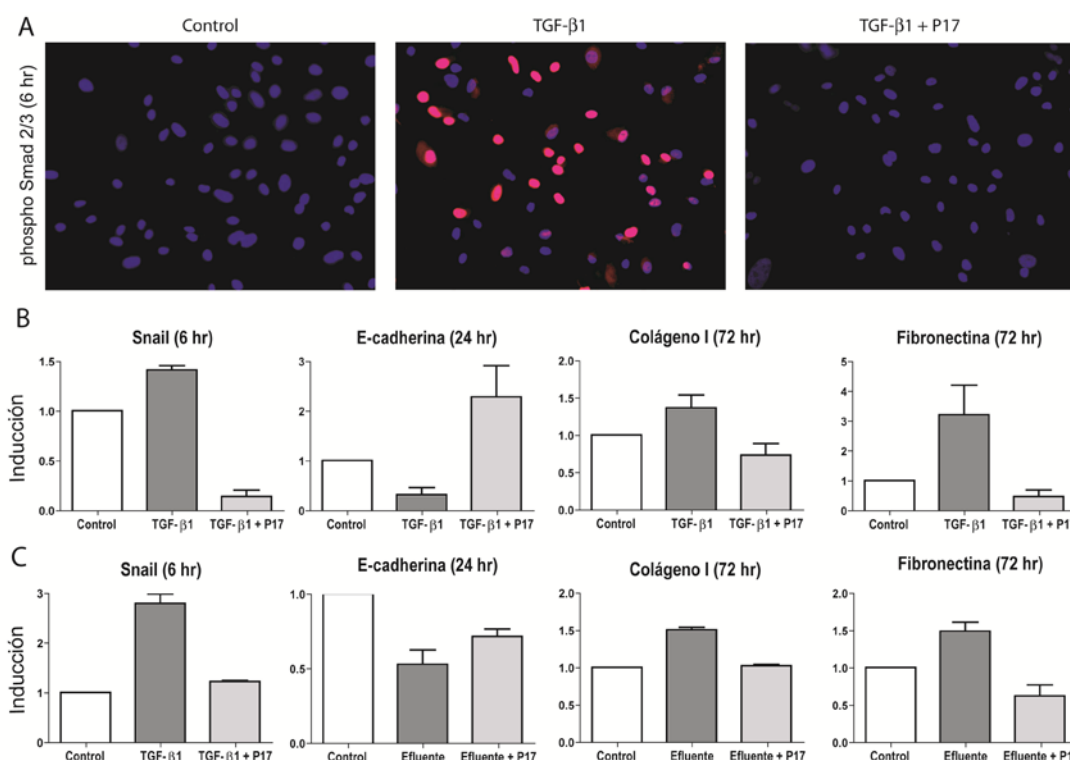


Figura 35. P17 bloquea la TEM de las células mesoteliales. Células mesoteliales extraídas de epiplón fueron tratadas durante 6, 24 o 72 horas con TGF-β1 (1 ng/mL) o efuyente de pacientes que sufrieron peritonitis, en la presencia o ausencia de P17 (150 µg/mL). (A). La inmunofluorescencia muestra marcaje nuclear de las formas activas de Smad 2/3 en las células mesoteliales tratadas con TGF-β1 tras 6 horas (medio). Las células mesoteliales co-tratadas con TGF-β1 y P17 (derecha) no muestran activación de Smad 2/3, al igual que las células sin tratar (derecha). El experimento se repitió al menos 3 veces, mostrando un experimento representativo. Aumento 200 x. (B y C) Los datos de RT-PCR cuantitativa, muestran que el péptido P17 bloquea la inducción de Snail y previene la bajada de expresión de E-cadherina, y además bloquea el aumento de los marcadores de TEM colágeno I y fibronectina. Las barras indican media ± error estándar de tres experimentos independientes.

6.4.2. Los péptidos bloqueantes de TGF-β1 disminuyen las alteraciones estructurales y funcionales, producidas en el peritoneo por la exposición a líquido de diálisis

Analizamos si los péptidos bloqueantes del TGF-β1, pueden prevenir el deterioro de la membrana peritoneal, en un modelo de ratón de exposición a líquido de diálisis. Los ratones fueron instilados diariamente con un líquido estándar (conteniendo lactato como tampón y altos niveles de PDGs) a través de unos catéteres subcutáneos, que permiten la instilación del líquido a la cavidad peritoneal. Los péptidos se suministraron diluidos en el mismo líquido de diálisis, diferenciándose los grupos en el tipo de péptido empleado. Así, se dividieron en los grupos PDF (péptido control diluido), PDF+P17 (P17 diluido) y PDF+P14 (P144 diluido). Como grupo control, se utilizaron ratones que fueron

instilados diariamente con salino, también a través de catéteres instalados en el peritoneo (Control). El líquido fue instilado diariamente por un total de 5 semanas.

Los análisis histológicos de biopsias peritoneales, muestran que la exposición al líquido de diálisis produce una pérdida de la monocapa de células mesoteliales, así como un incremento del grosor peritoneal cuando se compara con el grupo control (figuras 36 A y B). La administración de los péptidos P17 o P144 posee un efecto de preservación del mesotelio y de reducción de la fibrosis de la membrana peritoneal (figuras 36 A y B). Estos datos fueron confirmados mediante RT-PCR, usando muestras de RNA extraídas de biopsias de peritoneo parietal, que sirvieron para analizar diversos marcadores mesenquimales. El análisis muestra, que la exposición a líquido de diálisis provoca una fuerte inducción del mRNA de colágeno I, fibronectina y α -SMA. El tratamiento con los péptidos P17 o P144 ha sido capaz de interferir en la inducción de estas moléculas de carácter mesenquimal (figura 36 C). Para determinar el efecto de la exposición al líquido de diálisis sobre la expresión de TGF- β 1, se midieron los niveles de esta citoquina en muestras, de los efluentes peritoneales, de los diferentes grupos de ratones. Los resultados muestran que la exposición al líquido de diálisis, induce un gran aumento de los niveles de TGF- β 1. La administración de P17 y P144 reduce de manera significativa la concentración de esta citoquina, sugiriendo la existencia de una realimentación positiva en la expresión peritoneal de TGF- β 1 (figura 36 D). Como se muestra en la figura 36 E, existe una correlación entre el grosor submesotelial y la expresión de TGF- β 1, indicando que esta citoquina juega un papel central en la fibrosis peritoneal.

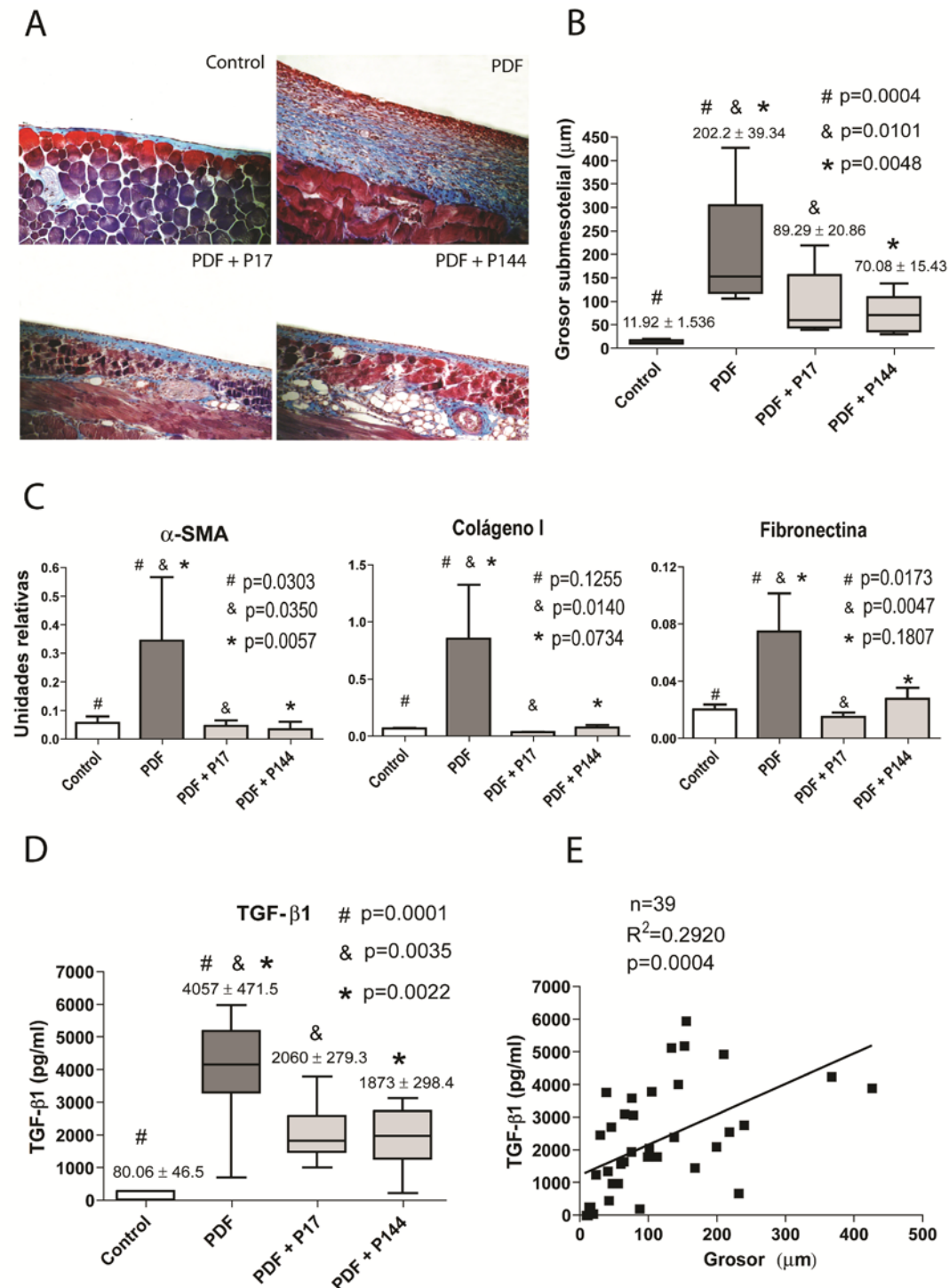


Figura 36. La administración de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 P17 y P144 decrece el grosor peritoneal en un modelo de ratón. Los ratones recibieron diariamente una instilación de líquido de diálisis durante 5 semanas. (A) La exposición a líquido de diálisis incrementa la deposición de componentes de matriz extracelular, así como el grosor de la membrana peritoneal. El tratamiento con los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 reduce ambos efectos, como muestran las medidas tomadas, de los cortes teñidos con tricrómico de Masson (imágenes representativas). (B) Las cajas representan los percentiles 25 y 75, la mediana, el mínimo y máximo. Los números sobre las cajas indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos. Aumento 200 x. (C) Los datos de RT-PCR cuantitativa muestran que la exposición al líquido de diálisis aumenta la expresión del marcador mesenquimal α -SMA, así como el de los componentes de matriz extracelular colágeno I y fibronectina. La administración de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 reduce estos efectos. Las barras indican media \pm error estándar. (D) La medida de la concentración de TGF- β 1 mediante ELISA, en los efluentes peritoneales de los ratones, muestra un incremento de este factor de crecimiento, en los animales tratados con líquido de diálisis. La administración de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1, logra reducir la producción de dicha citoquina. Las cajas representan

picogramos por mililitro y representan la mediana, mínimo y máximo, así como los percentiles 25 y 75. Los números sobre las cajas indican la media \pm error estándar de los niveles de TGF- β 1. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos. (E) Correlación entre el grosor mesotelial (μ m) y los niveles de TGF- β 1 (pg/mL) en los ratones analizados (Regresión de Spearman, $p = 0.0004$; $n = 39$).

Para testar el efecto de los péptidos bloqueantes sobre la angiogénesis formada a causa del tratamiento de diálisis peritoneal, los vasos del peritoneo parietal fueron teñidos con anticuerpo anti-CD31. El análisis muestra un incremento significativo en el número de vasos, en los ratones que han sido tratados con líquido de diálisis, en comparación con aquellos tratados con salino. Además, el tratamiento con los péptidos P17 y P144 ha logrado reducir la angiogénesis de un modo significativo (figuras 37 A y B). Para estudiar con mayor profundidad los efectos del bloqueo del TGF- β 1 sobre la angiogénesis, se midieron los niveles de VEGF en el efluente de los animales. La exposición a líquido de diálisis incrementa fuertemente la concentración de VEGF en la cavidad peritoneal, y la administración de los péptidos P17 y P144 reduce de manera significativa los niveles de este factor (figura 37 C). Los resultados muestran la existencia de una correlación entre la formación de vasos y la producción de VEGF, reforzando la noción de la relevancia de este factor de crecimiento en el proceso de angiogénesis (figura 37 D).

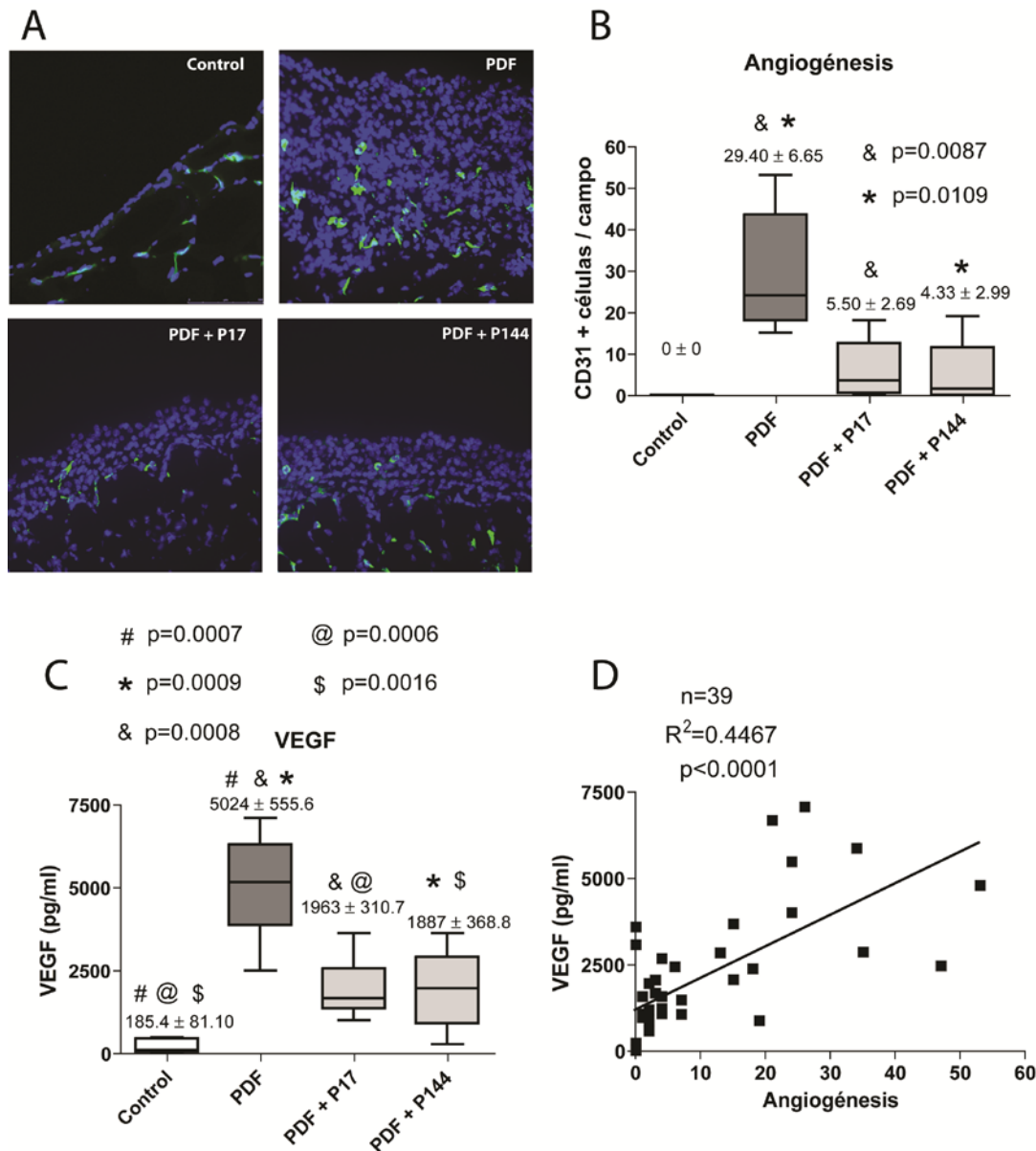


Figura 37. El tratamiento con los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 P17 y P144 decrecen la angiogénesis y la producción de VEGF inducida por la exposición a los líquidos de diálisis. Los ratones recibieron diariamente una instilación de líquido de diálisis durante 5 semanas. Se suministró diluido en el líquido un péptido control (4mg/kg/día: PDF, n=10), P17 (4mg/kg/día: PDF + P17, n=11), o P144 (4mg/kg/día: PDF + P144, n=11). Como control se utilizó un grupo que fue instilado diariamente durante 5 semanas con salino (Control; n=7). (A) La exposición a líquido de diálisis incrementa la angiogénesis peritoneal. La administración con los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 reduce de manera significativa el número de vasos, determinados mediante tinción con anti-CD31 (imágenes representativas). (B) Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75 así como los valores máximo y mínimo. Los números sobre las cajas indican la media \pm error estándar de la tinción de anti-CD31. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos. Aumento 200 x. (C) El análisis de los niveles de VEGF, mediante ELISA en el efuente peritoneal de los ratones muestra un incremento en los animales tratados con líquido de diálisis. La administración de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 reducen de manera significativa la producción de VEGF. Las cajas simbolizan las medidas en picogramos por mililitro y representan la mediana, los percentiles 25 y 75 y los valores máximo y mínimo. Los números sobre las cajas indican la media \pm error estándar de los valores de VEGF. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre grupos. (D) Correlación entre angiogénesis (tinción positiva para anti-CD31) y los niveles de VEGF (pg/mL) en el total de los ratones analizados (Regresión de Spearman, $p < 0.0001$; $n = 39$).

Para analizar la relevancia funcional de los cambios morfológicos observados en el peritoneo, se realizó un test de ultrafiltración peritoneal el último día del

tratamiento. Los ratones de los grupos Control, PDF+P17 y PDF+P144 fueron instilados con 2 ml de solución de líquido de diálisis y 30 minutos después, el total del líquido peritoneal fue recolectado. Como se muestra en la figura 38 A, los volúmenes recuperados por los animales expuestos a líquido de diálisis, fueron menores que los de aquellos animales tratados con salino. Un aumento significativo de dicho volumen fue observado en los animales expuestos a los péptidos P17 y P144, lo que implica una mejora en el funcionamiento de la membrana peritoneal. Los análisis estadísticos realizados, muestran que la pérdida de ultrafiltración correlaciona con el grosor peritoneal (figura 38 B), la angiogénesis (figura 38 C) y la producción de VEGF (figura 38 D). Estos resultados demuestran que el bloqueo de TGF- β 1 disminuye los efectos deletéreos ocasionados por la exposición a líquido de diálisis del peritoneo, siendo capaz de reducir la fibrosis y la angiogénesis, así como de mejorar la función de la membrana peritoneal.

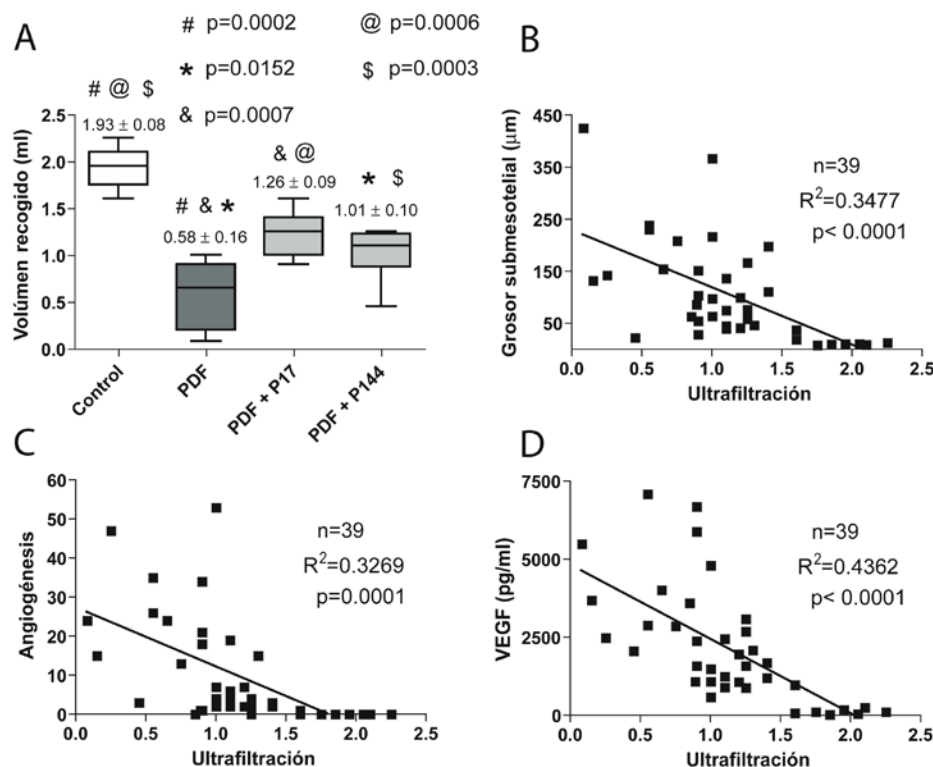


Figura 38. El tratamiento con los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 mejora la ultrafiltración peritoneal. Se realizó un test de ultrafiltración de 30 minutos en el último día de los tratamientos. (A) El volumen recuperado de los animales expuestos a líquido de diálisis (PDF; n=10) es menor que la de estos ratones instilados con solución de salino (Control; n=7). Los ratones tratados con los péptidos bloqueantes de TGF- β 1, mostraron un aumento en la ultrafiltración. Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo. Los números encima de las cajas indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre los grupos. (B a D) Correlaciones entre la ultrafiltración y el grosor peritoneal (μ m), angiogénesis (tinción anti-CD31), y los niveles de VEGF (pg/ml) en el grupo total de ratones analizados (Regresión de Spearman, n = 39).

6.4.3. Los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 reducen la acumulación de los fibroblastos FSP-1⁺ en respuesta a la diálisis peritoneal

Un cambio histológico característico de la membrana peritoneal durante la diálisis peritoneal es la acumulación de fibroblastos activados (fibroblastos FSP-1⁺) en la zona compacta submesotelial (Jimenez-Heffernan *et al.*, 2004). Como se puede observar en la figura 39, no se observa expresión de FSP-1 en el peritoneo parietal de los animales tratados con salino. En contraste, los fibroblastos FSP-1⁺ están presentes en la zona compacta del peritoneo, de los ratones tratados con líquido de diálisis (figura 39 A y B). El tratamiento con los péptidos P17 y P144 resultó en una reducción significativa en la acumulación submesotelial de fibroblastos FSP-1⁺ (figura 39 A y B). Los resultados indican que la citoquina TGF- β 1 presenta un efecto sobre el número de fibroblastos FSP-1⁺ presentes en la zona compacta submesotelial.

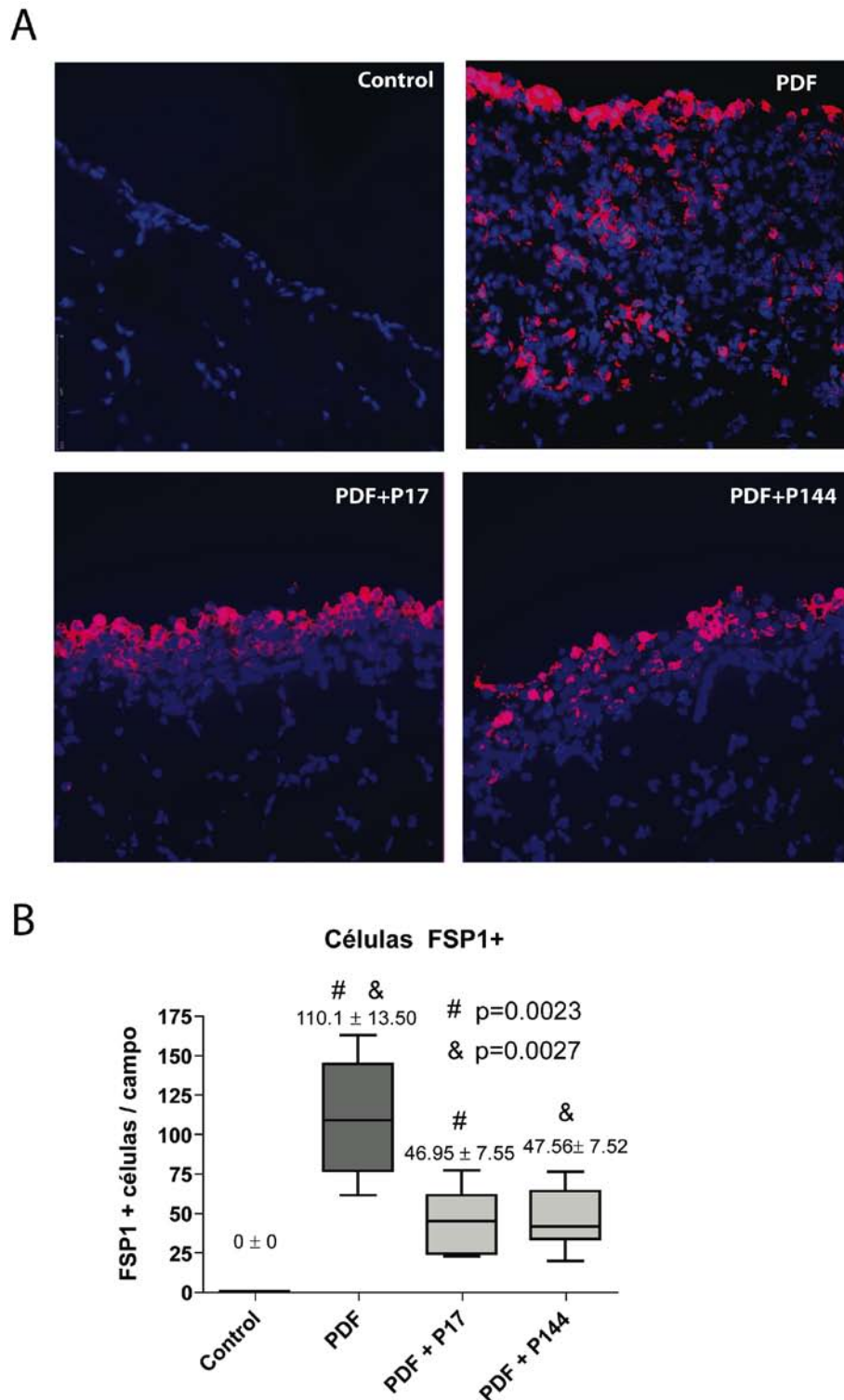


Figura 39. Los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 reducen el número de fibroblastos activados en la zona compacta del peritoneo parietal. (A) El análisis de inmunofluorescencia de cortes de peritoneo parietal teñidos con anticuerpo anti-FSP1 (rojo), muestra la acumulación de fibroblastos en el espacio submesotelial en el grupo PDF (n=10). La administración de los péptidos P17 o P144 reduce el número de células FSP-1 positivas por campo (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). No se encuentra expresión de FSP-1 en los animales instilados con salino (Control, n=7). Se muestran imágenes representativas. Aumento 200 x. (B) La reducción del número de fibroblastos positivos causada por los péptidos P17 o P144 es significativa. Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo. Los números encima de las cajas indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre los grupos.

6.4.4. Los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 ejercen un mayor efecto sobre la transición epitelio-mesenquimal inducida por diálisis peritoneal

Para caracterizar las diferentes subpoblaciones de fibroblastos activados en el peritoneo dañado durante la exposición, se realizaron inmunofluorescencias dobles. En ellas, se usó el anticuerpo anti-FSP-1 combinado con anti-Pan-citoqueratina (marcador mesotelial), anti-CD45 (marcador pan-leucocítico expresado por fibrocitos) o anti-CD31 (marcador endotelial). Como era de esperar, la expresión de citoqueratina está restringida al mesotelio preservado, en las muestras de tejido de los ratones control (figura 40 a). En este mismo grupo, la expresión de CD31 está confinada a vasos más profundos, localizados en el tejido muscular (figura 40 g). Además, en el peritoneo de los animales control, no existe expresión de FSP-1 (figura 40) y las células CD45⁺ apenas son detectables (figura 40 d). En el tejido peritoneal de los ratones instilados con líquido de diálisis, existe una acumulación de fibroblastos FSP-1⁺, y diferentes números de ellos co-expresan citoqueratina (figuras 41 A y B), CD45 (figuras 42 A y B) o CD31 (figuras 43 A y B). Las poblaciones más abundantes, en términos de células por campo de visión, fueron estas co-expresando citoqueratina⁺/FSP-1⁺ y CD45⁺/FSP-1⁺, mientras sólo un pequeño número de fibroblastos resultaron ser positivos para CD31⁺/FSP-1⁺ (figura 43 A). El promedio de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones es de 37% para citoqueratina⁺/FSP-1⁺, 34% para CD45⁺/FSP-1⁺ y 5% para CD31⁺/FSP-1⁺ (figura 44 B). El 24% remanente sólo expresa FSP-1 (figura 44 B). Con respecto al efecto del tratamiento con los péptidos inhibidores de TGF- β 1, su administración ha logrado reducir de manera significativa el número de células por campo de los fibroblastos citoqueratina⁺/FSP-1⁺ (figuras 41 A y B), CD45⁺/FSP-1⁺ (figuras 42 A y B) y CD31⁺/FSP-1⁺ (figuras 43 A y B). Cabe resaltar que el número de fibroblastos que sólo expresan FSP-1 no cambia substancialmente después del bloqueo con los péptidos bloqueantes. Esto podría indicar que la activación de los fibroblastos residentes, mediada por la exposición a líquido de diálisis, no es dependiente de TGF- β 1 (figura 44 A y 45). Proporcionalmente, la reducción más importante causada por los péptidos bloqueantes, fue observada en la subpoblación citoqueratina⁺/FSP-1⁺ (figuras

44 A y B). Este dato sugiere un mayor efecto del TGF- β 1 sobre la generación de fibroblastos a través de la TEM, que por medio de otros orígenes.

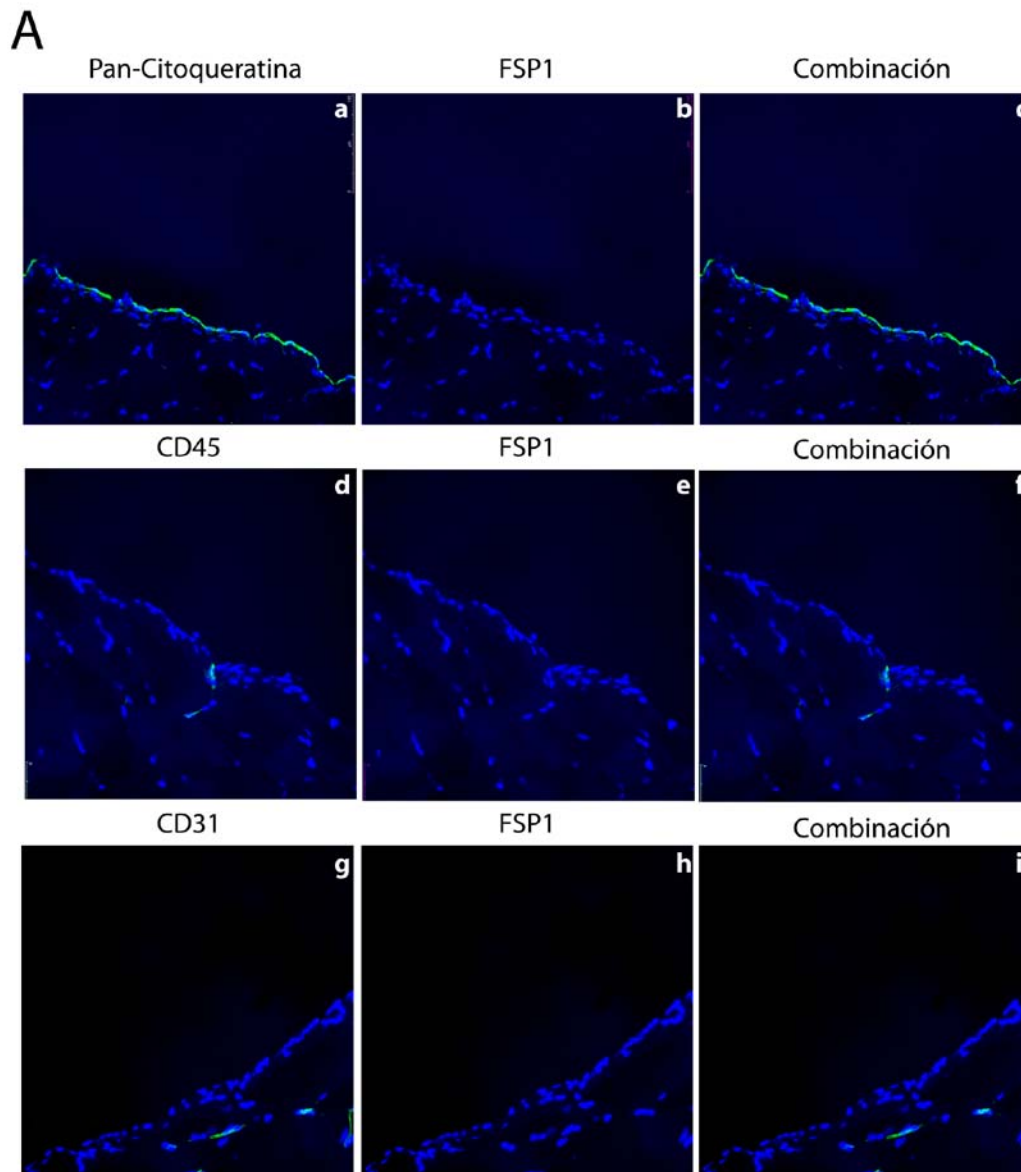


Figura 40. Inmunofluorescencia doble del peritoneo parietal de ratones instilados con salino. En el peritoneo de los ratones control, la expresión de citoqueratina se encuentra sólo en la monocapa de células mesoteliales y la expresión de CD31 se haya confinada a vasos que se encuentran en el tejido muscular. En estos ratones se encuentran vagamente células FSP-1⁺ y CD45⁺. Aumento 200 x.

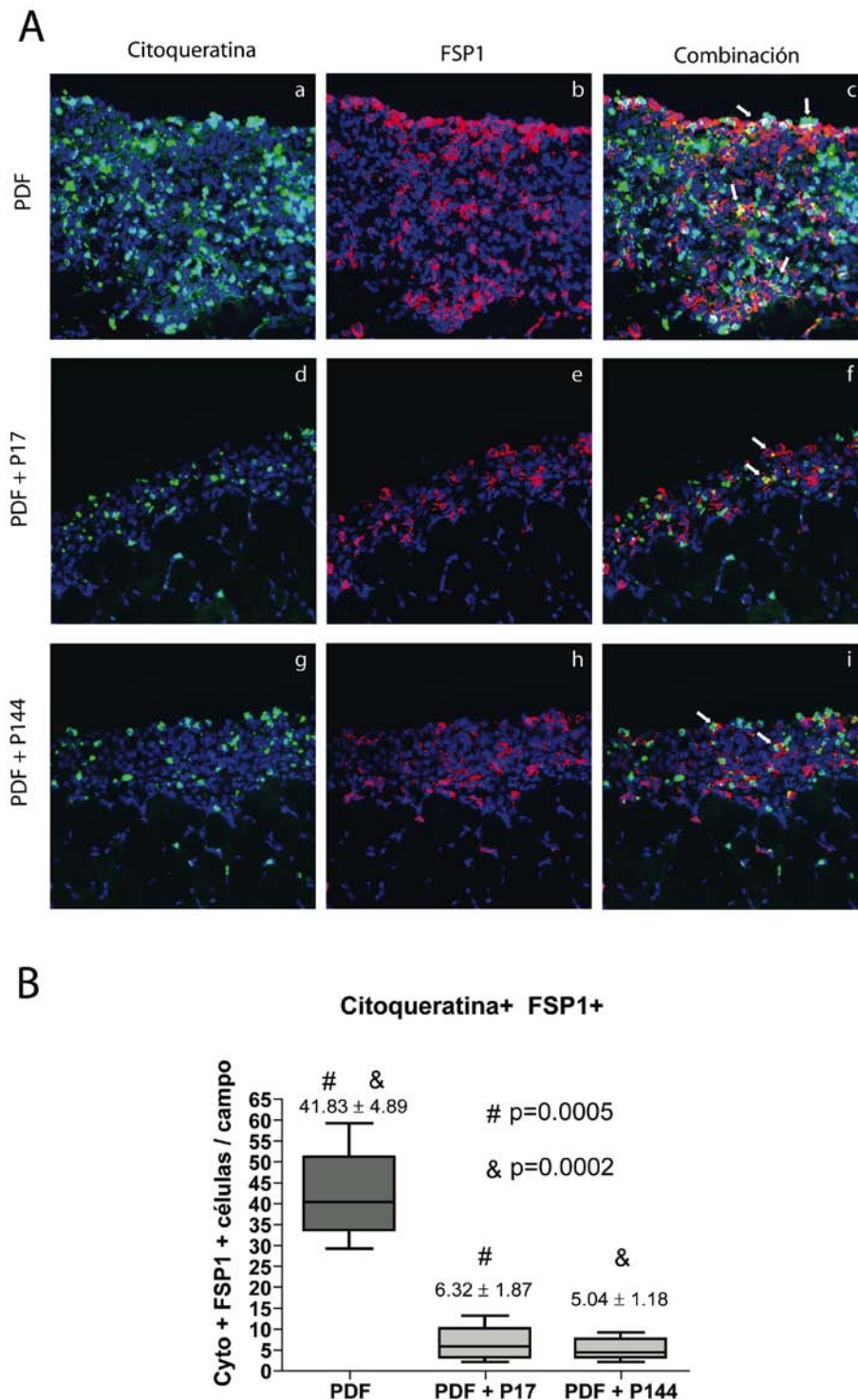


Figura 41. Efecto de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 en el número de los fibroblastos activados derivados de las células mesoteliales. (A) El análisis mediante inmunofluorescencia de los cortes de peritoneo parietal, teñidos con anticuerpo anti-Pan-citoqueratina (verde) y anti-FSP-1 (rojo) muestra la acumulación de células mesoteliales transdiferenciadas en el espacio submesotelial (células citoqueratina positivas) en el grupo PDF (n=10), algunas de las cuales co-expresan FSP-1 (células amarillas en el canal de combinación). La administración de los péptidos P17 y P144 reduce el número de células citoqueratina⁺/FSP-1⁺ por campo (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Se muestran imágenes representativas. Aumento 200 x. (B) La reducción del número de fibroblastos positivos citoqueratina⁺/FSP-1⁺, por los péptidos P17 o P144 son significantes. Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo. Los números encima de las cajas indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre los grupos

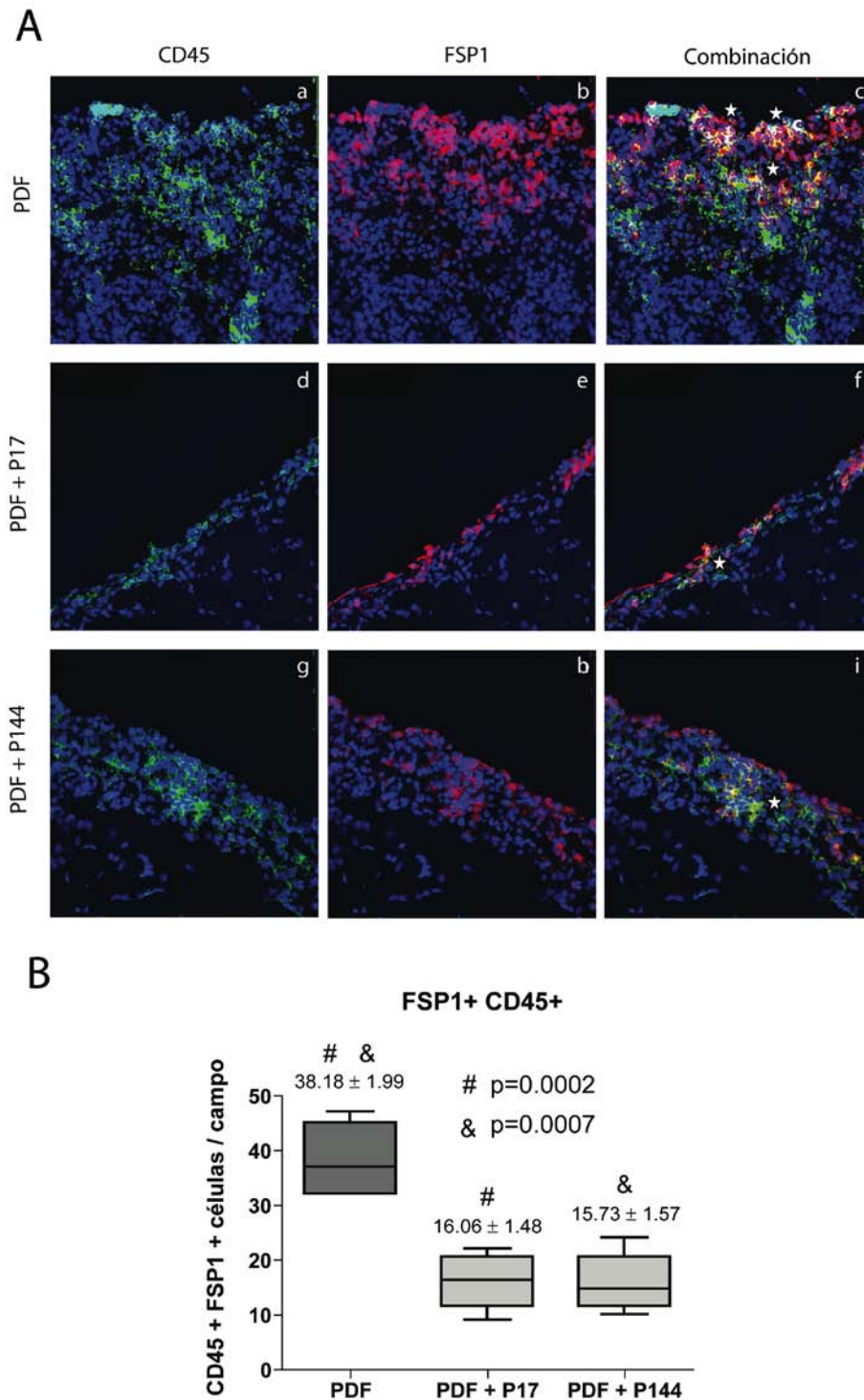


Figura 42. Efecto de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 en el número de fibroblastos activados derivados de médula ósea. (A) El análisis de inmunofluorescencia de cortes de peritoneo parietal, teñidos con anticuerpos anti-CD45 (verde) y FSP-1 (rojo), muestra el reclutamiento de leucocitos en el grupo PDF (N=10), alguno de los cuales co-expresan FSP-1 (células amarillas en el panel de la mezcla de canales). La administración de los péptidos P17 y P144 reduce el número de células positivas por campo CD45⁺/FSP-1⁺ (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Se muestran imágenes representativas. Aumento 200 x. (B) La reducción del número de fibroblastos CD45⁺/FSP-1⁺ positivos por parte de P17 y P144 resulta ser significativa. Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo. Los números encima de las cajas indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre los grupos

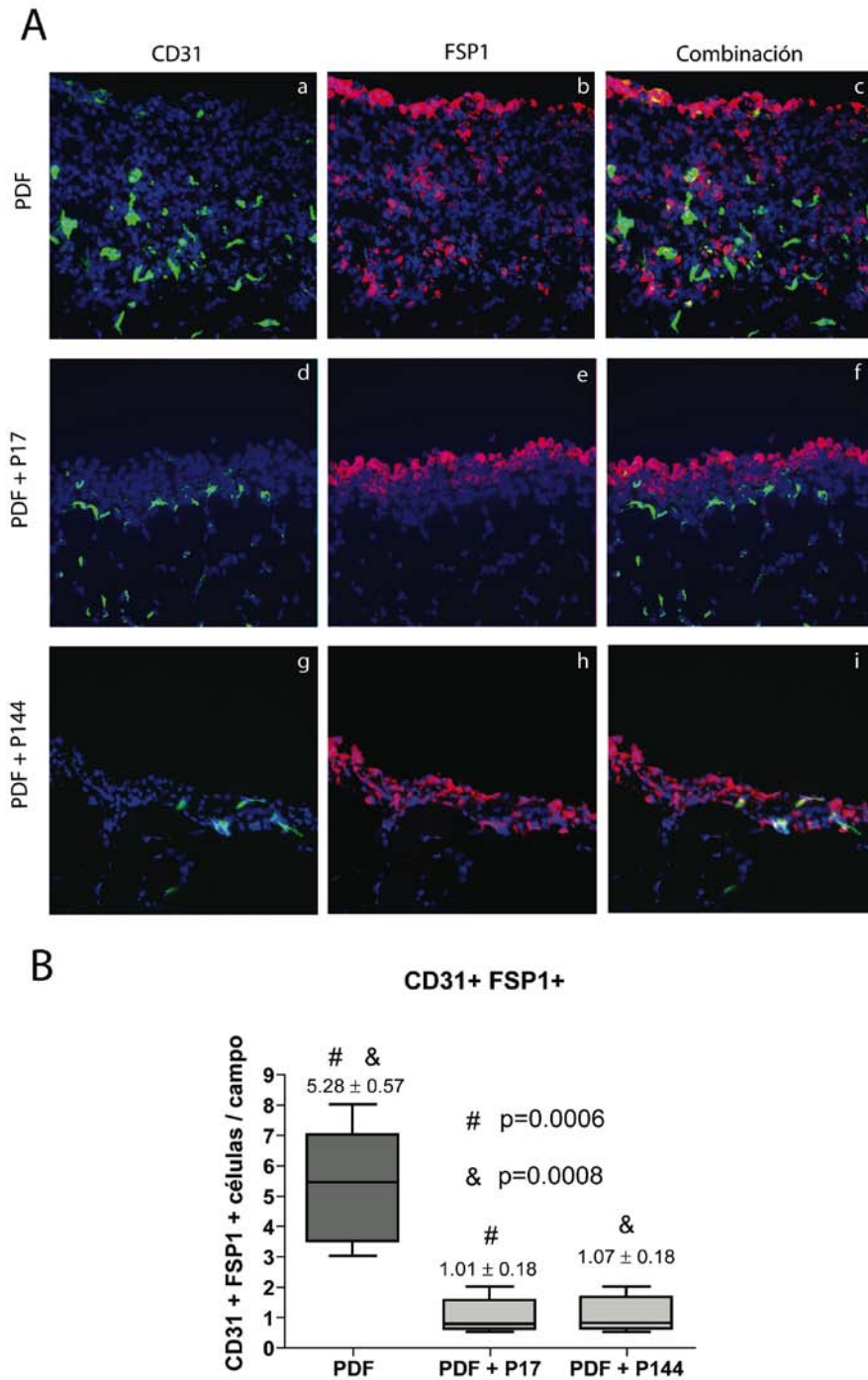


Figura 43. Efectos de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 sobre los fibroblastos derivados de las células endoteliales. (A) El análisis de inmunofluorescencia, de cortes de peritoneo parietal, teñidos con anticuerpos anti-CD31 (verde) y anti-FSP-1 (rojo), muestra la aparición de células doble positivas CD31⁺/FSP-1⁺ en el grupo PDF (n=10). La administración de péptidos P17 o P144 reduce el número de células CD31⁺/FSP-1⁺ (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Se muestran imágenes representativas. Aumento 200 x. (B) La reducción de los fibroblastos CD31⁺/FSP-1⁺ mediante P17 o P144 es significativa. Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo. Los números encima de las cajas indican la media \pm error estándar. Los símbolos representan las diferencias estadísticas entre los grupos

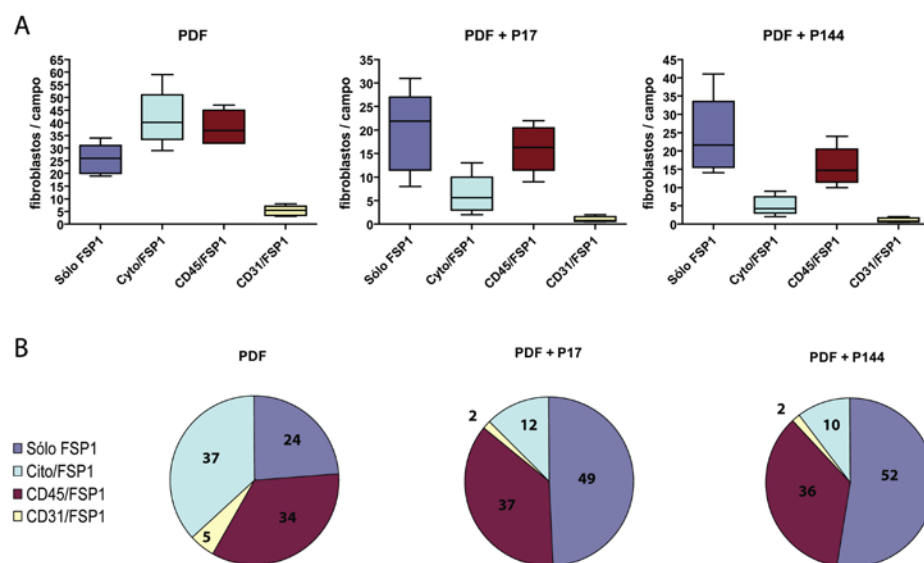


Figura 44. Efectos de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 sobre las diferentes subpoblaciones de fibroblastos activados. (A) Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo del número de los fibroblastos de diverso origen de los grupos PDF, PDF + P17, y PDF + P144. (B) Los círculos indican el porcentaje promedio, de las diferentes subpoblaciones de fibroblastos en los grupos PDF, PDF + P17, y PDF + P144.

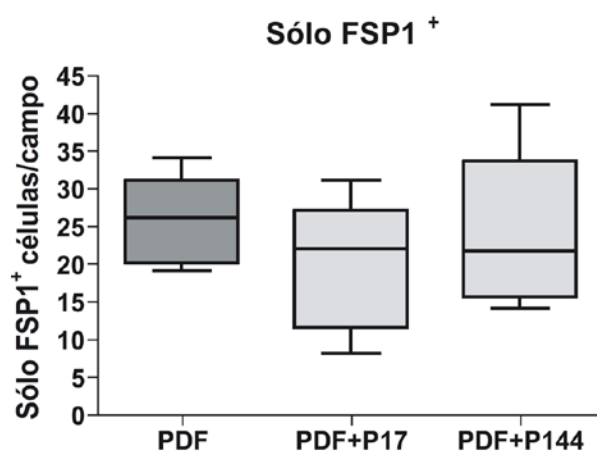


Figura 45. Los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 no afectan el número de fibroblastos que sólo expresan FSP-1. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, la mediana y los valores máximo y mínimo.

6.4.5. Las células con un fenotipo intermedio (citoqueratina⁺/FSP-1⁺) poseen características de miofibroblastos y capacidad fibrogénica

Para analizar si los miofibroblastos pueden derivar de las células mesoteliales en el peritoneo dañado, se realizó una inmunofluorescencia en dos colores, empleando los anticuerpos anti- α -SMA y anti-Pan-citoqueratina. Los resultados

muestran que la exposición al líquido de diálisis, induce la acumulación de fibroblastos citoqueratina⁺/α-SMA⁺. La administración de los péptidos P17 y P144 reduce de manera significativa el número de esta subpoblación de miofibroblastos (figura 46). El número de fibroblastos citoqueratina⁺/α-SMA⁺ por campo, en cada uno de los grupos, es aproximadamente la mitad de la subpoblación citoqueratina⁺/FSP-1⁺ (figura 46). Este dato, indica que el marcador FSP-1 aparece antes que α-SMA, durante el proceso de diferenciación miofibroblástico.

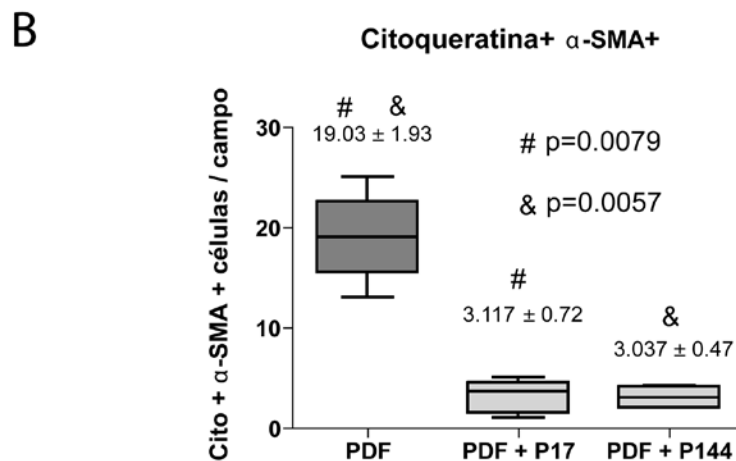
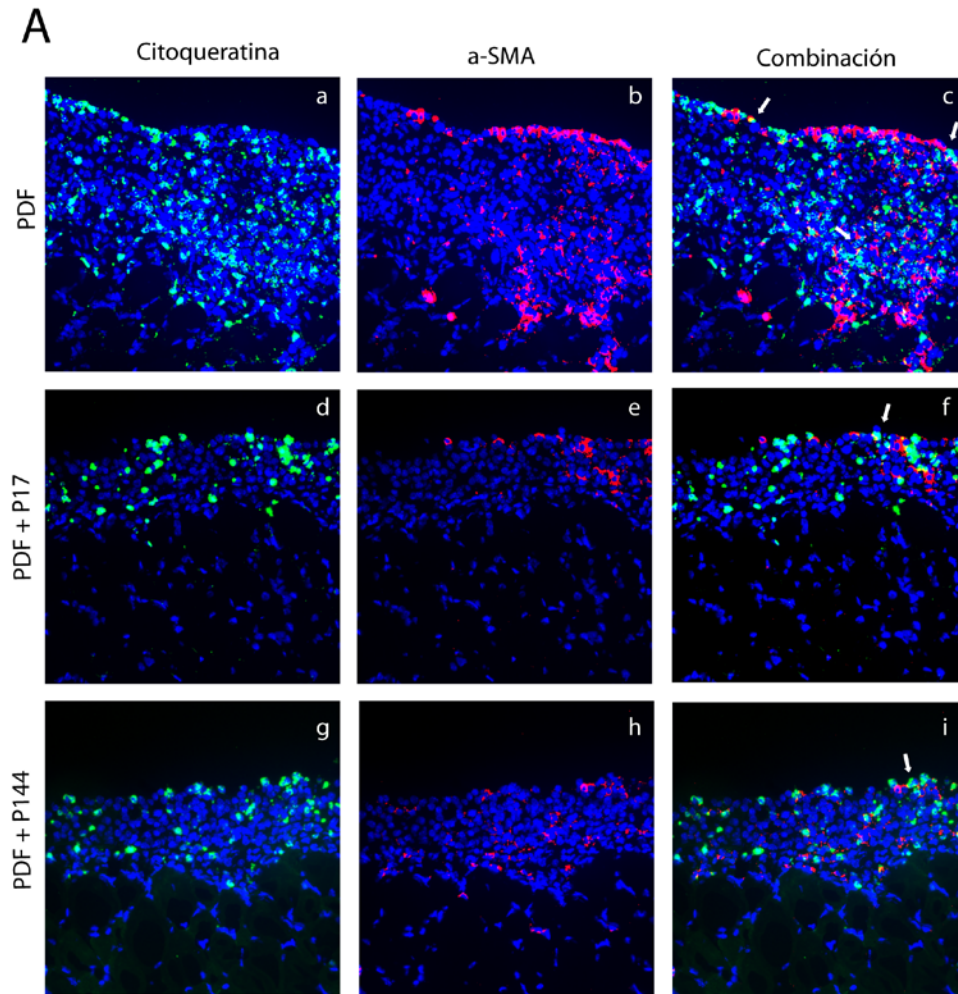


Figura 46. Efectos de los péptidos bloqueantes de TGF- β 1 sobre el número de miofibroblastos que derivan de las células mesoteliales. (A) Inmunofluorescencia doble tiñendo citoqueratina (verde) y α -SMA (rojo). Se observa una acumulación de células mesoteliales trans-diferenciadas en el espacio submesotelial (células citoqueratina positiva) en el grupo PDF, algunas de las cuales co-expresan α -SMA (células amarillas en el panel de combinación). La administración de los péptidos P17 y P144 reduce el número de células citoqueratina⁺/ α -SMA⁺. Se muestran imágenes representativas. Aumento 200 x. (B) La reducción es estadísticamente significativa. Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo. Los números superiores indican la media \pm error estándar. Los símbolos muestran las diferencias estadísticas entre los grupos.

Para demostrar la naturaleza patogénica de los fibroblastos con fenotipo intermedio (citoqueratina⁺/FSP-1⁺), se exploró la capacidad de estas células para producir componentes de matriz extracelular en experimentos *in vitro*. Los análisis muestran, que en la TEM inducida en células mesoteliales mediante TGF- β 1, la sobre-expresión de colágeno I y fibronectina comienza a las 48 horas y se mantiene hasta el último día analizado (figura 47 A). Una inmunofluorescencia de tres colores de las células mesoteliales tratadas con TGF- β 1, durante 72 horas, revela que casi todas las células citoqueratina⁺/FSP-1⁺ muestran expresión de fibronectina (figura 47 B). El mismo triple análisis, llevado a cabo por inmunofluorescencia, fue realizado en células mesoteliales con fenotipo no-epitelioide, extraídas de efluentes de pacientes. En este caso, se observa que la gran mayoría de células son citoqueratina⁺/FSP-1⁺, existiendo una pequeña proporción de células que son positivas para FSP-1 y negativas para citoqueratina. Ambas poblaciones expresan fibronectina, indicando su capacidad para producir matriz de carácter fibrótico. Estos resultados muestran que las células con un fenotipo intermedio (citoqueratina⁺/FSP-1⁺), ya poseen capacidad fibrogénica.

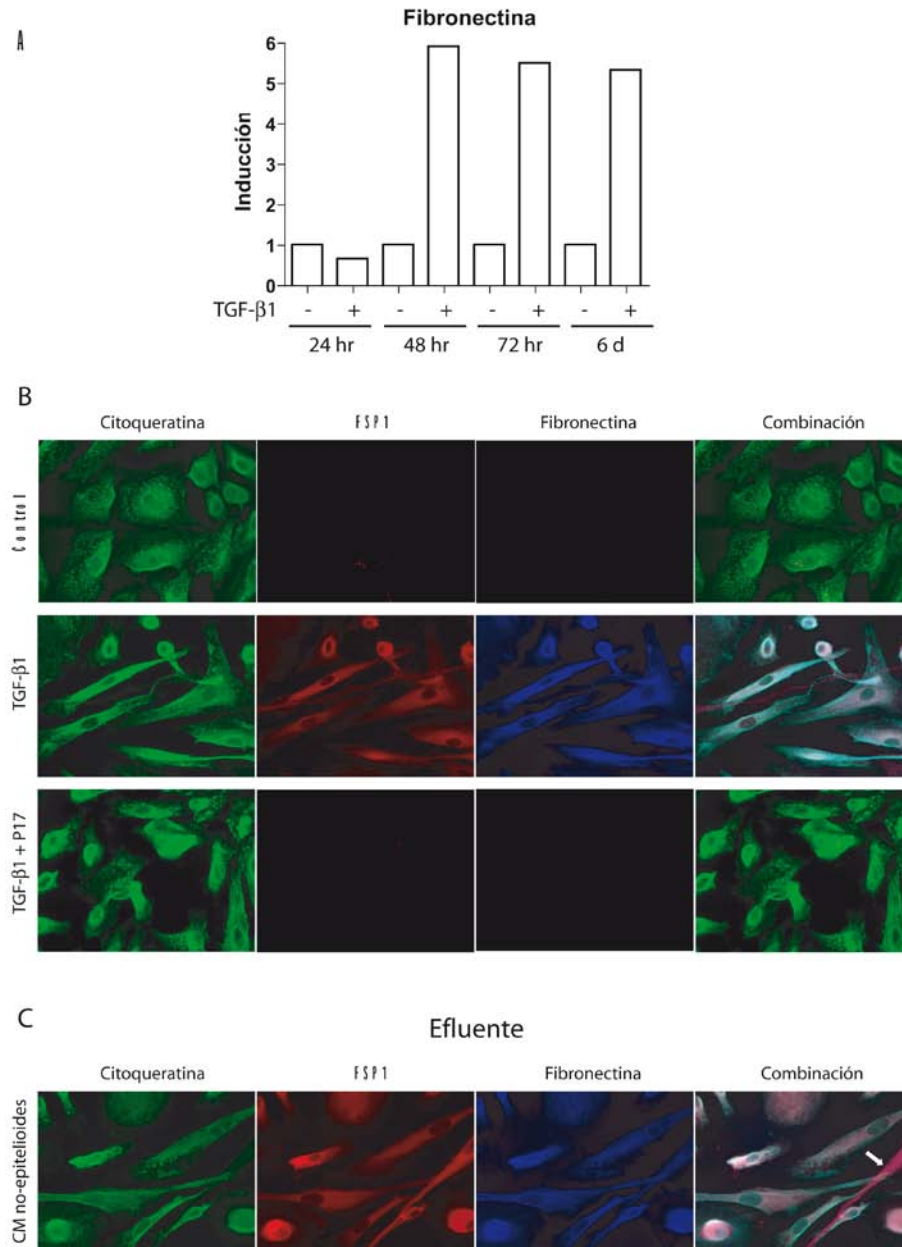


Figura 47. El fenotipo intermedio Citoqueratina⁺/FSP1⁺ muestra capacidad fibrogénica. (A) El análisis mediante RT-PCR cuantitativa, revela que las células mesoteliales estimuladas 48 horas con TGF-β1 (1ng/ml) expresan fibronectina. (B) Mediante inmunofluorescencia se observa que las células mesoteliales tratadas durante 72 horas con TGF-β1 (1ng/ml) son positivas para citoqueratina (verde), FSP-1 (rojo) y fibronectina (azul). Las células control, así como aquellas tratadas con TGF-β1 (1ng/ml) y P17 (150 µg/ml), sólo muestran tinción verde (citoqueratina). (C) El análisis mediante inmunofluorescencia muestra que las células mesoteliales no-epiteloides, obtenidas de pacientes en diálisis peritoneal, son en su mayoría positivas para citoqueratina, FSP-1 y fibronectina. Sin embargo, algunas de estas células no presentan tinción verde (citoqueratina). Aumento 400 x.

6.4.6. La sobre-expresión de TGF- β 1 induce la acumulación en el peritoneo de fibroblastos FSP-1⁺, la mayoría de los cuales co-expresa citoqueratina

En estudios previos, se ha mostrado que la sobre-expresión de TGF- β 1 reproduce los cambios estructurales y funcionales que tienen lugar en el peritoneo de pacientes en diálisis peritoneal. En ese mismo trabajo, concluyen que la TEM, aparece en los primeros estadios (días 4 y 7) del daño peritoneal ocasionado por la sobre-expresión de TGF- β 1 (Margetts *et al.*, 2001 y 2005). Para caracterizar las diferentes subpoblaciones de fibroblastos activados, en respuesta a la sobre-expresión de TGF- β 1, se realizó un experimento en el que se transfirió el gen de TGF- β 1 activado, en el peritoneo de ratones, a través de una infección con adenovirus. Los animales fueron sacrificados 4 días después de la infección. Secciones del peritoneo parietal fueron sometidas a tinción doble, usando anticuerpos anti-FSP-1 en conjunción con los anticuerpos anti Pan-citoqueratina, CD45 o CD31. Como era de esperar, los ratones infectados con el adenovirus control, muestran un peritoneo con histología normal, con una monocapa mesotelial, y una delgada zona compacta con unos pocos vasos localizados en el tejido muscular. Además, la expresión de FSP-1 en los ratones control, esta ausente y la expresión de CD45 es detectada vagamente (figura 48). En contraste, los ratones infectados con adenovirus que expresa TGF- β 1, muestran pérdida de la monocapa mesotelial, y una fuerte respuesta proliferativa, así como una gran acumulación de fibroblastos FSP-1⁺ (figura 49 A). La población más importante de fibroblastos FSP-1⁺ es la que co-expresa citoqueratina⁺/FSP-1⁺ (figuras 49 A y B), representando alrededor del 64% de los fibroblastos activados (figura 49 C). También existe un importante número de fibroblastos CD45⁺/FSP-1⁺ (figuras 49 A y B), que suponen un 29%, mientras que los fibroblastos CD31⁺/FSP-1⁺ aparecen marginalmente representados (figura 49 C). Estos resultados demuestran que TGF- β 1 ejerce un mayor efecto sobre las células mesoteliales, que vía TEM, constituyen la mayor fuente de fibroblastos en el peritoneo dañado.

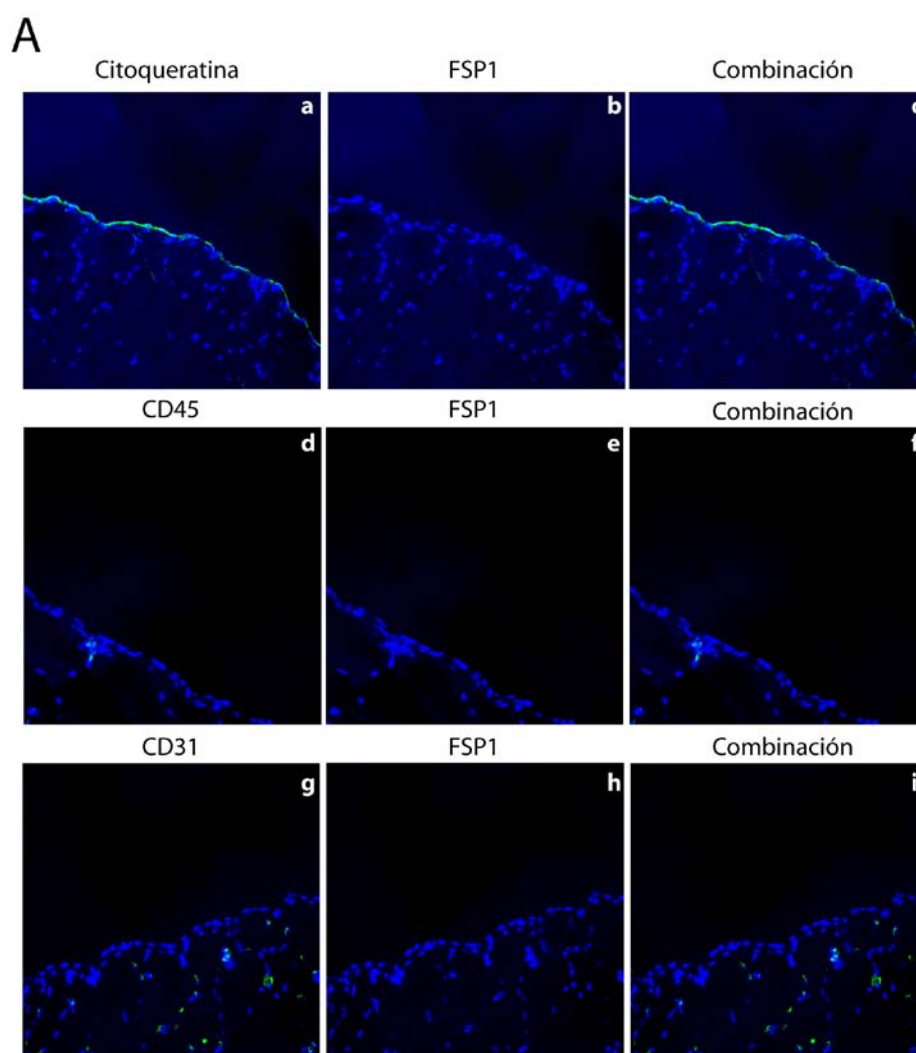


Figura 48. Inmunofluorescencia doble de secciones de peritoneo parietal de ratones infectados con un vector adenovirico vacío. Las imágenes muestran que estos ratones presentan expresión de citoqueratina tan solo en la monocapa de células mesoteliales y que la expresión de CD31 es exclusiva de vasos que aparecen en el tejido muscular. Difícilmente se encuentran células positivas para FSP-1 o CD45. Aumento 200 x.

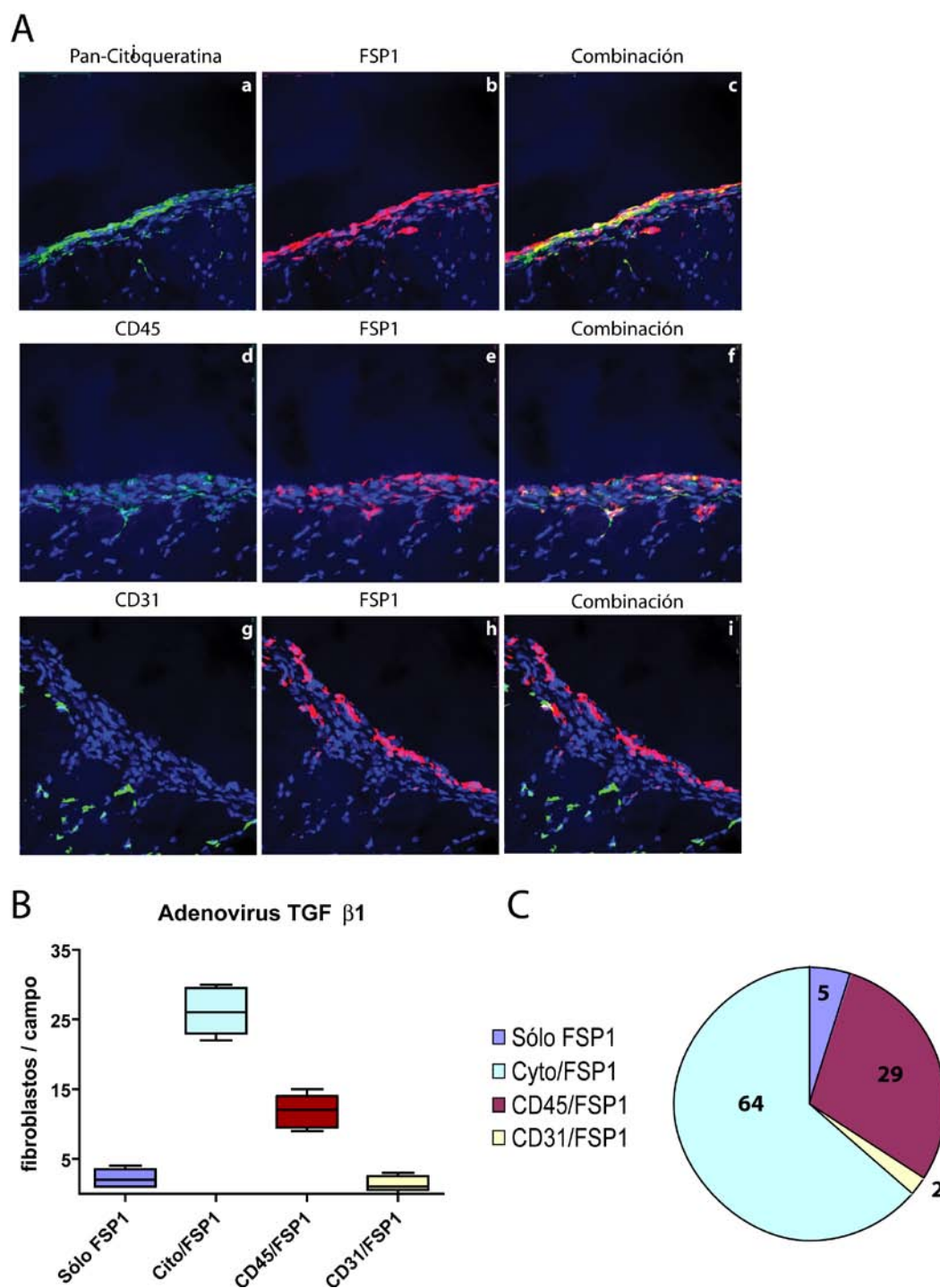


Figura 49. La sobre-expresión de TGF- β 1 en el peritoneo induce la acumulación de fibroblastos activados, muchos de los cuales derivan de células mesoteliales. Los ratones fueron infectados con un adenovirus que codifica TGF- β 1 activo mediante una inyección intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados después de 4 días después de la infección. (A) Las secciones de peritoneo parietal fueron sometidas a tinción doble usando los anticuerpos anti-FSP-1 (rojo) en conjunción con los anticuerpos anti-Pan-citoqueratina, CD45 o CD31 (estos tres últimos en verde). Se ha encontrado una fuerte acumulación de fibroblastos citoqueratina⁺/FSP-1⁺ (células amarillas en el panel de mezcla). Se muestran imágenes representativas. Aumento 200 x. (B) Las cajas representan la mediana, los percentiles 25 y 75, así como los valores máximo y mínimo del número de los fibroblastos de las diferentes subpoblaciones. (C) Los círculos muestran los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de los fibroblastos

7. DISCUSIÓN

7.1. BMP-7

La presencia de las células mesoteliales que han sufrido TEM en el efluente y en el peritoneo de los pacientes en diálisis fue demostrada por vez primera en una publicación en el año 2003 (Yañez-Mo *et al.*, 2003). Durante los últimos años, se han conocido evidencias de que la conversión mesenquimal de las células mesoteliales es un mecanismo importante en el deterioro funcional y estructural del peritoneo (Aroeira *et al.*, 2005 y 2009; Del Peso *et al.*, 2008). Desde la perspectiva del nefrólogo, el aspecto más importante de la identificación de la TEM de las células mesoteliales, como un evento clave en el fallo funcional de la membrana, es que dicho proceso puede ser modulado por una serie de factores endógenos y farmacológicos (Liu, 2004; Aroeira *et al.*, 2007). En este contexto, el factor endógeno BMP-7 ha demostrado ser capaz de bloquear y revertir la conversión mesenquimal de diferentes tipos de células epiteliales y endoteliales en condiciones *in vitro*. El mecanismo de acción descrito es mediante la activación de Smad-5, que interfiere con la ruta de Smad 2/3, promovida por TGF- β 1 (Liu, 2004; Zeisberg *et al.*, 2003 y 2007). Ha sido también demostrado, en varios modelos animales, que el tratamiento con BMP-7 previene y revierte diversas patologías fibróticas agudas y/o crónicas asociadas a TEM (Liu, 2004; Zeisberg *et al.*, 2003 y 2007; Vukicevic *et al.*, 1998). Sin embargo, sólo unos pocos trabajos sobre el papel de BMP-7 en la conversión mesenquimal de las células mesoteliales o en la alteración de la membrana peritoneal han sido elaborados (Vargha *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Vargha y colaboradores (2006) demostró que el BMP-7 es capaz de promover la reversión, desde el fenotipo mesenquimal al epitelial, de las células mesoteliales procedentes de los efluentes de pacientes en diálisis peritoneal. Otro estudio, realizado por Yu y colaboradores (2009) demostró que el BMP-7 es capaz de bloquear la TEM *in vitro* de las células mesoteliales, inducida por altas concentraciones de glucosa. En este mismo estudio, se relata que el tratamiento con BMP-7 es capaz de revertir la fibrosis peritoneal, en un grupo de ratas previamente sometidas a diálisis peritoneal. Sin embargo, la habilidad del BMP-7, de contrarrestar la TEM *in vitro* de las células mesoteliales mediada por TGF- β 1, así como la de prevenir el deterioro

del peritoneo en experimentos *in vivo*, no había sido probada. En el presente trabajo, mostramos que las células mesoteliales expresan BMP-7 de manera constitutiva y que presentan una activación basal de Smad 1/5/8. La inducción de la TEM con diferentes estímulos tiene como consecuencia una bajada de expresión de BMP-7 y la inactivación de las proteínas SMADs específicas de la ruta de BMP-7. La inhibición de la señalización de BMP-7 mediada por TGF- β 1, puede ser explicada por la propia bajada de expresión de BMP-7, o alternativamente, por la subida de expresión de moduladores de las vías de BMP-7 y TGF- β 1. En este contexto, ha sido demostrado que el CTGF, una citoquina que es inducida en las células mesoteliales por el tratamiento con TGF- β 1 (Leung *et al.*, 2009; Zarrinkalam *et al.*, 2003; Szeto *et al.*, 2005), es capaz de inhibir BMP-7 y activar la señalización de TGF- β 1, a través de una unión directa que tiene lugar en el espacio subcelular (Abreu *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2008). Además, la señalización de BMP-7 puede también estar influenciada por otros miembros de la superfamilia del TGF- β 1, así como por otros moduladores de BMP-7, como gremlin, noggin, Kcp y USAG-1 (Zeisberg, 2006). Debido a esto, la contribución relativa de estos diferentes factores, en la inhibición de la ruta del BMP-7 por el TGF- β 1, necesita de un mayor estudio.

La exposición de las células mesoteliales, al líquido de diálisis con alto contenido en PDGs, tiene como consecuencia la bajada de expresión de BMP-7 y la subida de TGF- β 1. Interesantemente, cuando las células mesoteliales son expuestas a los líquidos con bajo contenido en PDGs, estos tienen un tenue impacto en la TEM de las células mesoteliales (Aroeira *et al.*, 2009), no existe represión de BMP-7 y no se produce inducción de síntesis de TGF- β 1. La única diferencia entre este tipo de líquido y el estándar se encuentra en la cantidad de PDGs, y no en otras propiedades, como el pH, el tampón utilizado o la alta cantidad de glucosa. En contraste, un estudio reciente ha demostrado que el medio de cultivo con alta cantidad de glucosa es capaz de inducir TEM así como la bajada de expresión de BMP-7 (Yu *et al.*, 2009). Los autores de este trabajo concluyen que esos efectos son debidos a la D-glucosa y no a la alta osmolaridad o a los PDGs, ya que la L-glucosa no induce la TEM, como relata ese mismo trabajo. Una explicación de estas aparentes discrepancias, puede ser que diferentes tipos de PDGs, con diferente impacto en la TEM, son

generados por la D-glucosa y la L-glucosa durante el proceso de esterilización o durante su reposo en el almacenamiento. Nosotros creemos que las altas concentraciones de glucosa y los PDGs pueden tener un papel en la TEM *in vitro*, dependiendo de las condiciones experimentales, y ciertamente poseen efectos aditivos en el daño peritoneal inducido por los líquidos de diálisis.

Los datos presentados en este trabajo demuestran que la adición de rhBMP-7 exógeno previene la inactivación de Smad 1/5/8 causada por TGF- β 1, provocando, en condiciones *in vitro*, un completo bloqueo de la TEM inducida por dicha citoquina. Estos resultados sugieren que el BMP-7 posee un papel en la preservación el fenotipo epiteliode de las células mesoteliales.

La administración del rhBMP-7 a las ratas expuestas al líquido de diálisis, resulta en una preservación de la monocapa de células mesoteliales y en una reducción de las células mesoteliales invasoras, demostrando que el rhBMP-7 es también efectivo *in vivo* en la prevención de la TEM. Además, el tratamiento con rhBMP-7 reduce la deposición de componentes de matriz extracelular y la formación de nuevos vasos en el peritoneo parietal, indicando una asociación entre la TEM de las células mesoteliales, la fibrosis y angiogénesis. Interesantemente, el tratamiento con rhBMP-7 no posee efecto en la respuesta inflamatoria ni regenerativa. La conclusión obtenida a estos resultados es que estos dos procesos son independientes de la TEM y probablemente estén por encima de esta.

En un estudio reciente, usando 50 pacientes en diálisis peritoneal, se demostró que los niveles de BMP-7 medidos en efluente, 4 semanas después del inicio de tratamiento, correlacionan con las características de transporte de estos. Este estudio muestra que aquellos pacientes que presentan un peor funcionamiento peritoneal, presentan los mayores valores de BMP-7 (Szeto *et al.*, 2008). A simple vista, estas observaciones pueden parecer contradictorias con nuestros resultados, ya que se esperaría una asociación negativa entre estos dos parámetros. Sin embargo, los niveles elevados de BMP-7 durante las primeras etapas de la diálisis peritoneal, podrían representar simplemente una intensa respuesta reparadora del tejido peritoneal lesionado. Este proceso resultaría en un incremento en la masa de las células mesoteliales, y por lo tanto en un aumento de expresión de BMP-7, ya que tanto en este trabajo

como en otro (Yu *et al.*, 2009) se ha demostrado que las células mesoteliales son capaces de sintetizar BMP-7. La mayor limitación de este estudio es el uso del rhBMP-7 en un modelo de ratón de diálisis peritoneal, que puede disparar una respuesta inmuno/inflamatoria contra esta proteína.

En resumen, nuestros resultados indican que las rutas del BMP-7 y el TGF- β 1, mantienen el balance del fenotipo de las células mesoteliales y que la adicción de rhBMP-7 exógeno, es capaz de bloquear por completo la conversión mesenquimal de las células mesoteliales. Este es el primer trabajo que relata el efecto preventivo del BMP-7 en el daño peritoneal en un modelo animal de diálisis peritoneal. Nosotros creemos que nuestros resultados, sobre los efectos beneficiosos del rhBMP-7, aportan evidencias sobre la factibilidad de considerar la TEM de las células mesoteliales, como una diana terapéutica para disminuir el deterioro de la membrana peritoneal en pacientes en diálisis peritoneal. Futuros estudios de la vía de señalización del BMP-7, proveerán otros modos de abordar la TEM que podrían tener todavía mayores efectos beneficiosos para los pacientes.

7.2. Inhibición de COX2

EL posible papel de COX-2 en el deterioro de la membrana peritoneal durante la diálisis peritoneal sigue siendo aún un tema de debate. Las prostaglandinas son producidas en la cavidad peritoneal de los pacientes en diálisis peritoneal, sobre todo durante episodios de peritonitis, y están implicadas en el incremento de la permeabilidad peritoneal a macromoléculas (Steinhauer *et al.*, 1986; Zemel *et al.*, 1993). Interesantemente, mientras la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, mediante la administración intraperitoneal de indometacina, resulta en una disminución de la hiperpermeabilidad de las macromoléculas durante la peritonitis, no posee ningún efecto sobre la permeabilidad en pacientes en diálisis peritoneal, estables y sin complicaciones (Douma *et al.*, 2001; Zemel *et al.*, 1995). Estos resultados sugieren que sólo las prostaglandinas aumentadas, probablemente aquellas producidas por COX-2, están implicadas en la disfunción del transporte peritoneal. Nosotros

demostramos que las células mesoteliales con fenotipo no-epitelioide extraídas de los efluentes, muestran un incremento en la expresión de COX-2. Además, las tasas de transporte peritoneal se correlacionan con los niveles de expresión de COX-2, sugiriendo que las células mesoteliales que han sufrido TEM son una fuente importante de prostaglandinas, que contribuyen a la respuesta inflamatoria peritoneal, en los pacientes en diálisis peritoneal. También mostramos que el fenotipo de las células mesoteliales extraídas de los efluentes, así como los niveles de expresión de Snail y COX-2, están asociados con el tipo de líquidos de diálisis utilizados en pacientes. El tratamiento con líquido de diálisis estándar, posee un gran impacto sobre la TEM de las células mesoteliales y sobre el aumento de expresión de Snail y COX-2. Esto no sucede cuando se usan líquidos con baja concentración de PDGs o cuando se combina el uso del líquido estándar con fluidos basados en icodextrina. La sobre-expresión de COX-2, paralela a la inducción del inductor de TEM Snail, nos llevo a analizar si podría tener un papel en la transdiferenciación fenotípica de estas células. Sin embargo, los experimentos *in vitro* demostraron que la inhibición de COX-2 no es capaz de prevenir la TEM inducida por TGF- β 1 e IL-1 β , ni la inducción de los marcadores propios de este proceso. Por el contrario, se ha demostrado recientemente, que cuando las células mesoteliales son estimuladas con altas concentraciones de glucosa, la inhibición de COX-2 previene la sobre-expresión de TGF- β 1, así como la formación de componentes de matriz extracelular (Liu *et al.*, 2007). Una explicación para estas posibles discrepancias puede ser que la inhibición de COX-2 *in vitro*, es capaz de prevenir de modo indirecto, el efecto de las altas concentraciones de glucosa sobre la expresión de componentes de matriz extracelular, mediante la inhibición de la síntesis de TGF- β 1 (Liu *et al.*, 2007). Sin embargo, en estas condiciones, no impediría el efecto directo de las citoquinas inflamatorias y profibróticas en la TEM de las células mesoteliales.

El tratamiento con celecoxib se ha mostrado capaz de preservar la membrana peritoneal de los ratones instilados con líquidos de diálisis. Dado que la inflamación es una respuesta temprana del peritoneo a los líquidos de diálisis, el efecto beneficioso del celecoxib podría ser una consecuencia de sus propiedades anti-inflamatorias (Turini *et al.*, 2002). Es conocido que las

lesiones de los tejidos de mamíferos adultos, causadas por traumas o cirugías, inducen inflamación y formación de tejido cicatricial como consecuencia de un proceso de curación defectuoso (Ferguson *et al.*, 2004). En contraste, durante el periodo fetal o en los periodos cercanos al nacimiento, la inflamación debida a lesiones es tenue y el proceso de curación tiene lugar sin que se produzca cicatriz (Ferguson *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que ratones deficientes en macrófagos, neutrófilos y mastocitos (PU.1 null mice) son incapaces de tener una respuesta inflamatoria normal pero si que muestran tejido fibrótico (Martin *et al.*, 2003). Así, la participación de la inflamación en la reparación del tejido, no parece ser esencial para su buen término (Martin *et al.*, 2005). Se puede especular que la inhibición de la inflamación, provocada con el tratamiento por celecoxib, contribuye a la reducción de la fibrosis peritoneal en ratones expuestos a líquidos de diálisis.

Nuestros datos indican que la angiogénesis, inducida por el tratamiento con líquido de diálisis, es reducida solo parcialmente en los ratones tratados con celecoxib. Esto puede ser explicado por el hecho de que no sólo las células inflamatorias, sino otros tipo celulares como las células mesoteliales, son capaces de producir diferentes factores proangiogénicos (Lai *et al.*, 2000 y 2007). Por lo tanto, mientras que el tratamiento con celecoxib puede bloquear la producción de factores angiogénicos, por parte de las células inflamatorias, no posee efecto alguno sobre la producción de estos por parte de las células mesoteliales. Además, bajo condiciones de estrés, los fibroblastos residentes en el peritoneo, pueden ser tenidos en cuenta también para la producción de factores angiogénicos (Giatromanolaki *et al.*, 2007; Tunyogi-Csapo *et al.*, 2007).

La recuperación parcial de la función de la membrana peritoneal, en animales expuestos a líquidos de diálisis, y tratados con celecoxib, podría ser explicada por la inhibición de la síntesis de la PGE₂, lo cual causa una disminución de la permeabilidad vascular (Yang *et al.*, 2003). Nuestros resultados son apoyados por el hecho de que, los ratones tratados con líquido de diálisis bajo en PDGs, muestran un pequeño número de células inflamatorias y una disminución en la fibrosis, en comparación con los ratones tratados con líquido estándar. Estos datos demuestran el beneficio del uso de las soluciones de diálisis biocompatibles.

Los resultados presentados en este trabajo indican que la inflamación es una respuesta temprana a la exposición a los líquidos de diálisis, lo cual conlleva a la fibrosis peritoneal, mientras que la angiogénesis no parece depender exclusivamente de la respuesta inflamatoria. La inhibición de COX-2, o la prevención de su expresión mediante el uso de líquidos biocompatibles, pueden mejorar los efectos dañinos de los líquidos de diálisis en la membrana peritoneal, mediante reducción de la inflamación, acumulación de matriz extracelular, y engrosamiento. Todo ello tiene como consecuencia, una mejora en el funcionamiento del peritoneo como membrana semipermeable.

Somos conscientes de que los inhibidores de COX-2 no pueden ser usados fácilmente en la práctica clínica, al menos durante largo tiempo, ya que puede ser perjudicial para los pacientes desde un punto de vista cardiovascular (Harris *et al.*, 2006). Este problema es particularmente importante en pacientes con insuficiencia renal crónica, ya que poseen una tendencia a los problemas cardiovasculares (Garcia-López *et al.*, 2007). De todos modos, creemos que nuestros resultados aportan evidencias sobre la factibilidad de considerar la inflamación como una diana potencial para la mejora de la membrana peritoneal, en el tratamiento de la diálisis peritoneal. Estudios adicionales, sobre la respuesta inflamatoria peritoneal, aportaran dianas más específicas, con menores efectos secundarios y con menos riesgo cardiovascular.

7.3. Rosiglitazona

La exposición del peritoneo a los líquidos de diálisis induce inflamación y un ambiente diabético local. Esto se encuentra asociado con la generación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) y el deterioro funcional y estructural de la membrana peritoneal (Margetts *et al.*, 2003). Los agonistas de PPAR- γ poseen propiedades anti-inflamatorias y anti-diabéticas (Bensinger *et al.*, 2008; Yki-Jarvinen, 2004; Ricote *et al.*, 1998; Castrillo *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2000; Daynes *et al.*, 2002; Hontecillas *et al.*, 2007; Wohlfert *et al.*, 2007) y han sido asociados con propiedades anti-fibróticas, tanto en animales como en pacientes (Li *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2008; Pistrosch *et al.*,

2005). Sin embargo, el potencial de los agonistas de PPAR- γ como agentes terapéuticos para disminuir el daño sobre la membrana peritoneal, así como su mecanismo de acción, no ha sido explorado en profundidad (Bozkurt *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2008). En este estudio mostramos como la administración oral del agonista de PPAR- γ , rosiglitazona, es capaz de mejorar el daño peritoneal inducido por la exposición a los líquidos de diálisis, en un modelo de ratón. Los efectos positivos de la rosiglitazona incluyen la preservación del mesotelio, la reducción de la fibrosis y angiogénesis en el peritoneo parietal así como la mejora del funcionamiento de la membrana. En un estudio previo, se demostró que la administración intraperitoneal de rosiglitazona, a ratas instiladas con líquido de diálisis, fue capaz de preservar la monocapa de células mesoteliales y de mejorar la ultrafiltración, aunque la reducción de la fibrosis y angiogénesis en el peritoneo visceral no fue estadísticamente significativa (Yao *et al.*, 2006). Sin embargo, estas aparentes discrepancias pueden reflejar las diferencias entre los distintos tejidos analizados en los dos estudios (parietal o visceral).

La evidencia emergente indica que la TEM de las células mesoteliales, es un proceso importante en la acumulación de miofibroblastos en la zona compacta submesotelial. Además, se ha demostrado que la presencia de células mesoteliales transdiferenciadas, tanto en el efluente peritoneal como en el propio tejido, está asociado con un estado de alto transporte de la membrana peritoneal (Aroeira *et al.*, 2005 y 2009; Del Peso *et al.*, 2008). Nuestros datos demuestran que algunos miofibroblastos, localizados en la zona compacta de los ratones tratados con líquidos de diálisis, expresan citoqueratina, indicativa de su origen mesotelial. Interesantemente el tratamiento con rosiglitazona prácticamente suprime la acumulación de los miofibroblastos y preserva parcialmente el mesotelio. Estos datos indican que el tratamiento con este agonista de PPAR- γ es capaz de interferir con el proceso de TEM *in vivo*. Por contraste, los experimentos *in vitro*, muestran que la rosiglitazona es incapaz de bloquear la TEM inducida por el TGF- β 1, en las células mesoteliales extraídas de epíplon, o de revertir el fenotipo mesenquimal de las células mesoteliales procedentes de efluentes de pacientes en diálisis peritoneal. En nuestros estudios previos, en un intento de mimetizar la compleja mezcla de estímulos pro-fibróticos y pro-inflamatorios inducidos durante la diálisis

peritoneal, usamos una mezcla de TGF- β 1 e IL-1 β para inducir la TEM *in vitro* (Yañez-Mo *et al.*, 2003; Aroeira *et al.*, 2005 y 2009; Strippoli *et al.*, 2008). Demostramos, que el tratamiento de las células mesoteliales con TGF- β 1, es suficiente para inducir su conversión mesenquimal, y que la adicción de IL-1 β posee un efecto aditivo en el proceso (Yañez-Mo *et al.*, 2003; Strippoli *et al.*, 2008). En este estudio, demostramos que la rosiglitazona, no es capaz de bloquear la TEM inducida por TGF- β 1, por lo que tampoco es de esperar que la rosiglitazona pudiese impedir la TEM provocada por un estímulo mayor, como son el formado por la acción conjunta del TGF- β 1 más la IL-1 β . En apoyo a nuestros resultados, Yao y colaboradores (Yao *et al.*, 2007), demostraron que el tratamiento con rosiglitazona, no previene la inducción de la TEM de las células mesoteliales provocada por glucosa como estímulo, y que para ello es necesaria una mezcla de rosiglitazona y bloqueante del receptor de angiotensina II. Vale la pena apuntar que la TEM *in vivo*, se produce como resultado de una integración de diversas señales disparadas por múltiples factores, siendo difícil de asignar la jerarquía de cada uno de ellos. Así, se podría especular con la idea de que la rosiglitazona es capaz de prevenir la TEM *in vivo*, mediante la reducción de varios estímulos que inducen TEM, como pueden ser los AGEs y/o la inflamación. Usando anticuerpos anti-RAGE, en ratas urémicas o ratones deficientes en RAGE, se demostró que la interacción AGE-RAGE posee un papel clave en el daño peritoneal inducido por uremia y por exposición peritoneal al líquido de diálisis (De Vriese *et al.*, 2006; Schwenger *et al.*, 2006). Las células mesoteliales también expresan RAGE (Boulanger *et al.*, 2002) y los AGEs estimulan la producción de componentes de matriz extracelular por estas células, así como la síntesis de citoquinas y factores de crecimiento, como TGF- β 1 y VEGF (Nevado *et al.*, 2005; Margetts *et al.*, 2003; Boulanger *et al.*, 2007; Hirahara *et al.*, 2009; Conti *et al.*, 2008). Los AGEs pueden inducir también la TEM tanto *in vitro* como *in vivo* (De Vriese *et al.*, 2006; Hirahara *et al.*, 2009; Conti *et al.*, 2008) y pueden reducir la proliferación celular e inducir la apoptosis de las células mesoteliales (Boulanger *et al.*, 2004). En este estudio, demostramos que el tratamiento con rosiglitazona, disminuye la acumulación de los AGEs en el peritoneo parietal de ratones expuestos a líquidos de diálisis. Los mecanismos por los cuales la rosiglitazona reduce la acumulación

peritoneal de los AGEs, no están todavía bien definidos y pueden ser debido, simplemente, a su capacidad para bajar la concentración de glucosa. A este respecto, observamos que los ratones expuestos al líquido de diálisis y tratados con rosiglitazona, muestran una reducción significativa en la concentración de glucosa en el suero sanguíneo, comparado con aquellos no tratados con dicho fármaco. La parcial normalización de los niveles de glucosa en sangre, de los animales tratados con rosiglitazona, puede ser debido a un efecto de bajada sistémico y a una menor carga de glucosa desde la membrana peritoneal. Existe la hipótesis de que la rosiglitazona podría disminuir el ambiente diabético del peritoneo y como consecuencia, inducir una reducción de la glicosilación estructural de las proteínas. De hecho, ha sido demostrado que la administración de rosiglitazona a pacientes diabéticos, es capaz de disminuir los niveles circulantes de hemoglobina glicosilada (Goldberg *et al.*, 2005). La disminución de los AGEs en el peritoneo, en los ratones instilados con líquido de diálisis, concuerda con la reducción de la TEM, la fibrosis y angiogénesis, así como con la preservación del mesotelio en condiciones *in vivo*. Además, la mejor preservación del mesotelio, puede también ser explicada como un efecto directo de la rosiglitazona sobre la supervivencia, como indican los experimentos de apoptosis realizados *in vitro*. Aparte de la acumulación de los AGEs, el alto contenido en glucosa de los líquidos de diálisis puede promover el daño peritoneal mediante la activación del tejido graso abdominal (Axelsson *et al.*, 2006). En este contexto, los adipocitos expuestos a glucosa producen leptina, que puede promover la producción de TGF- β 1 por las células mesoteliales (Leung *et al.*, 2006) y cooperar con el TGF- β 1 en la inducción de la TEM de las células mesoteliales (Yang *et al.*, 2007). En consecuencia, puede ser esperado el encontrar altos niveles de leptina en los efluentes. Los agonistas de PPAR- γ están implicados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos y debido a ello, hipotetizamos que la rosiglitazona podría modular la producción de leptina por el tejido graso del peritoneo. Sin embargo, encontramos similares niveles de leptina en los efluentes de los ratones sometidos a la exposición del líquido de diálisis, tratados o no con rosiglitazona, sugiriendo que la protección ofrecida por la rosiglitazona no se encuentra relacionada con la activación del tejido adiposo.

Otro estímulo que promueve la TEM durante la exposición a los líquidos de diálisis es la inflamación. Los agonistas de PPAR- γ tienen propiedades anti-inflamatorias ya que estas drogas, son capaces de disminuir una gran cantidad de células del sistema inmune, pertenecientes tanto a la respuesta innata como a la adaptativa (Ricote *et al.*, 1998; Castrillo *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2000; Daynes *et al.*, 2002). También se ha descrito que son capaces de disminuir la respuesta de la activación de las células T reguladoras (Hontecillas *et al.*, 2007; Wohlfert *et al.*, 2007). Nuestros datos demuestran que la administración de rosiglitazona aumenta el reclutamiento de leucocitos a la cavidad peritoneal en los ratones tratados con líquido de diálisis. Este incremento celular es significativo para las células T CD4⁺ y CD8⁺ pero no para los linfocitos B o los macrófagos. Interesantemente, la administración con rosiglitazona, incrementa la población de las células T reguladoras CD4⁺CD35⁺ en la cavidad peritoneal de los ratones tratados con líquido de diálisis. Dos subpoblaciones de células T reguladoras (naturales o inducidas) han sido descritas, según se desarrollan o no en el timo (Maynard *et al.*, 2008). Las células T reguladoras naturales, que constituyen el 90% de la subpoblación periférica CD4⁺CD25⁺, están caracterizadas por la expresión del factor de transcripción FoxP3 y son plenamente funcionales y se desarrollan en el timo. Por contraste, la función inmunosupresora de las células T reguladoras inducidas es adquirida en la periferia desde los sencillos progenitores de células T CD4⁺CD25⁺. Las células T reguladoras inducidas, pueden ser subdivididas según la expresión de FoxP3 en dos subpoblaciones: CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ y CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ (o Tr1). Además, han sido descritas subpoblaciones de células T CD8⁺ con actividad reguladora. Recientes estudios han demostrado que los precursores CD8⁺ pueden ser inducidos a expresar FoxP3, con la consiguiente adquisición de la actividad inducida T reguladora, similar a la mostrada por las células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Maynard *et al.*, 2008; Kapp *et al.*, 2006). En este estudio, mostramos que la administración de rosiglitazona aumenta la expresión de FoxP3 en el componente celular que se encuentra en la cavidad peritoneal. Las proporciones relativas de estas células FoxP3 que derivan de células T reguladoras, naturales o inducidas requerirá un mayor análisis. Todos los tipos de células T reguladoras, especialmente las Tr1, son capaces de producir la

citoquina IL-10 (Maynard *et al.*, 2008). Como consecuencia, hemos encontrado mayores niveles de esta citoquina en los animales que han sido tratados con rosiglitazona, mientras que otras citoquinas no sufren este cambio significativo. Aunque una mejor caracterización de la respuesta inflamatoria en los animales tratados con rosiglitazona sería necesaria y requerirá más estudios, nuestros resultados sugieren que la rosiglitazona, dispara una respuesta anti-inflamatoria, mediada por las células T reguladoras.

En conclusión, mostramos que la administración de rosiglitazona, a los ratones expuestos al líquido de diálisis, produce efectos protectores pleiotrópicos en la membrana peritoneal, reduciendo la formación de AGEs y la inflamación, así como preservando la monocapa de células mesoteliales. Nuestros datos muestran, que la activación de PPAR- γ , puede ser una estrategia adecuada, para mejorar el deterioro peritoneal de los pacientes en diálisis peritoneal. Somos conscientes que los agonistas de PPAR- γ no pueden ser empleados fácilmente en la práctica clínica de los pacientes en diálisis peritoneal, al menos en tratamientos a largo plazo, ya que diversos efectos secundarios han sido descritos para estos fármacos (Rizos *et al.*, 2009). Esta cuestión es particularmente importante en pacientes con fallo renal en fase terminal, quienes obviamente poseen limitada su capacidad renal limpiadora (Aramwit *et al.*, 2008). Sin embargo, la rosiglitazona puede ser considerada una droga segura para su uso en el estado urémico dado que es metabolizado en el hígado, por lo que en este caso el riesgo de la acumulación de la droga, así como el prolongado estado hipoglicémico se ve minimizado (Iglesias *et al.*, 2006). Nosotros creemos que nuestros resultados aportan suficientes evidencias para que la inflamación pueda ser considerada como una diana terapéutica, para mejorar el deterioro del peritoneo, inducido por la diálisis peritoneal. Estudios adicionales, sobre la reacción inflamatoria peritoneal, conllevaran al desarrollo de intervenciones específicas con efectos adversos mínimos.

7.4. Péptidos bloqueantes de TGF- β 1 P17 y P144

Durante los últimos años se ha especulado que la TEM de las células mesoteliales podría ser considerada una diana terapéutica para preservar la estructura y función del peritoneo en los pacientes en diálisis peritoneal (Aroeira *et al.*, 2007; Margetts *et al.*, 2003; Devuyst *et al.*, 2010). En este complejo micro-ambiente, que ocurre durante el daño ocasionado por la diálisis peritoneal, un amplio rango de citoquinas y diversos factores ven aumentada su expresión, por lo que es complicado conocer la jerarquía del efecto de estos en la TEM y en el establecimiento y progresión del daño peritoneal (Aroeira *et al.*, 2007; Devuyst *et al.*, 2010). Sin embargo, dentro de todos ellos, el TGF- β 1 ha sido propuesto en varias ocasiones como la molécula clave del deterioro de la membrana peritoneal, inducido por el tratamiento de diálisis (Lai *et al.*, 2000; Liu, 2004; Gangji *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2008; Margetts *et al.*, 2001 y 2005; Patel *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009).

En este estudio, demostramos que la administración de dos péptidos bloqueantes de TGF- β 1, fue capaz de reducir de manera significativa la fibrosis peritoneal y la angiogénesis, preservar de manera parcial la función de la membrana, y bloquear de manera significativa la acumulación de fibroblastos FSP-1⁺ y α -SMA⁺. Nosotros habíamos demostrado con anterioridad, que en respuesta al tratamiento con diálisis peritoneal, los fibroblastos patogénicos pueden originarse a través de fibroblastos residentes y del mesotelio vía TEM (Yañez-Mo *et al.*, 2003; Jimenez-Heffernan *et al.*, 2004; Liu, 2004; Sandoval *et al.*, 2010). En este trabajo, mostramos la primera evidencia de que los fibroblastos FSP-1 pueden diferenciarse desde células derivadas de médula ósea (CD45), así como de la conversión local de células endoteliales (CD31) vía TEnM. El porcentaje de los fibroblastos FSP-1 derivados de células mesoteliales suponen un 37% del total de células FSP-1⁺, lo cual es similar a lo encontrado en fibrosis renal, en donde alrededor de un 36% procede de la conversión local de células tubulo-epiteliales a través de una TEM (Iwano *et al.*, 2002). En contraste, los porcentajes de fibroblastos FSP-1 que derivan de la médula ósea, así como de células endoteliales difiere enormemente de lo

observado en fibrosis renal. En ésta, el 14-15% de los fibroblastos patogénicos proceden de células procedentes de la medula ósea (CD45) (Iwano *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2006) y entre el 30-50% provienen de las células endoteliales (CD31) (Zeisberg *et al.*, 2008). En el peritoneo dañado por exposición a líquido de diálisis, hemos estimado que los fibroblastos procedentes de células de medula ósea y de células endoteliales es de un 34% y un 5% respectivamente. Estas diferencias observadas, sugieren que el microambiente de cada tejido y órgano, puede dictar las diferentes proporciones de las diversas subpoblaciones de fibroblastos patógenos. Además, puede especularse que la contribución de las diferentes subpoblaciones de fibroblastos en el deterioro funcional y estructural del peritoneo no es necesariamente dependiente de su relativa abundancia. En este sentido, hemos observado que la población más abundante de fibroblastos (citoqueratina⁺/FSP-1⁺) es la que muestra una mayor correlación con la fibrosis peritoneal. Sin embargo, la población que supone un menor porcentaje del total de células FSP-1⁺ (CD31⁺/FSP-1⁺) es la que muestra una mayor correlación con la pérdida de ultrafiltración (figura 50). Los fibroblastos que no expresan ninguno de los marcadores de origen analizados, es decir, aquellos que se mostraron positivos sólo para FSP-1, representan alrededor del 24% total de los fibroblastos. No encontramos correlación alguna entre esta población con la fibrosis peritoneal o con la pérdida de ultrafiltración (figuras 50 y 51). El origen de esta población no es del todo claro, ya que podrían derivar de fibroblastos residentes o de otras subpoblaciones de fibroblastos (por ejemplo, células citoqueratina⁺/FSP-1⁺ que hayan perdido la expresión de citoqueratina). Cabe resaltar que los miofibroblastos son comunmente observados en biopsias peritoneales de pacientes en diálisis peritoneal (Jimenez-Heffernan *et al.*, 2004; Aguilera *et al.*, 2005). Sin embargo, el origen heterogéneo de estos miofibroblastos y su papel en el establecimiento y progresión de los diferentes cambios relacionados con el deterioro peritoneal, no han sido explorados en profundidad. Sólo unos pocos estudios han sido llevados a cabo con pacientes en diálisis peritoneal, los cuales muestran una correlación significativa entre altas tasas de transporte peritoneal y la presencia de fibroblastos derivados de TEM en los efluentes o en tejido (Aroeira *et al.*, 2005 y 2009; Del Peso *et al.*, 2008; Mizutani *et al.*, 2010).

El TGF- β 1 es un fuerte inductor de TEM y TEnM (Yañez-Mo *et al.*, 2003; Aroeira *et al.*, 2005, 2007 y 2009; Li *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2003; Zeisberg *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2005) y también parece ser un factor clave en la diferenciación miofibroblástica de los fibrocitos residentes, así como en su reclutamiento (Bellini *et al.*, 2007; Desmouliere *et al.*, 1993; Iwano *et al.*, 2004). En este estudio, mostramos que la administración de dos péptidos capaces de bloquear el TGF- β 1 a ratones expuestos a líquidos de diálisis, causan una disminución significativa del número de fibroblastos de todas las subpoblaciones, a excepción de aquella sólo positiva para FSP-1. Un importante descubrimiento es que la reducción más pronunciada, realizada por la acción de los péptidos, se lleva a cabo en la subpoblación citoqueratina⁺/FSP-1⁺. Este hecho sugiere que el proceso de TEM esta fuertemente regulado por los niveles de TGF- β 1, al menos en el contexto de la exposición a los líquidos de diálisis. Dicha hipótesis, se encuentra reforzada por el hecho de que la sobre-expresión de TGF- β 1 resulta en una mayor acumulación de células citoqueratina⁺/FSP-1⁺, que en el resto de subpoblaciones de células FSP-1⁺. Sin embargo, no se puede descartar que este hecho no pueda deberse a una mayor accesibilidad al TGF- β 1, por parte de las células mesoteliales, con respecto a los otros tipos celulares presentes en el peritoneo. Además, los experimentos con células *in vitro* demuestran que la TEM de las células mesoteliales inducida mediante TGF- β 1, así como por efluentes de pacientes en diálisis peritoneal con episodios de peritonitis, puede bloquearse mediante el péptido bloqueante de TGF- β 1 P17.

Somos conscientes de que los agentes que bloquean de manera directa el TGF- β 1 no pueden emplearse de manera practica en la diálisis peritoneal, al menos como tratamiento a largo plazo, ya que el TGF- β 1 posee una importante función moduladora en las respuestas inmune e inflamatoria (Yoshimura *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Se espera que futuros estudios, sobre las vías de señalización de TGF- β 1 implicados en la conversión mesenquimal de las células mesoteliales, puedan proveer de estrategias más específicas, para que así, el tratamiento de preservación de la membrana peritoneal, tenga el menor de los efectos secundarios.

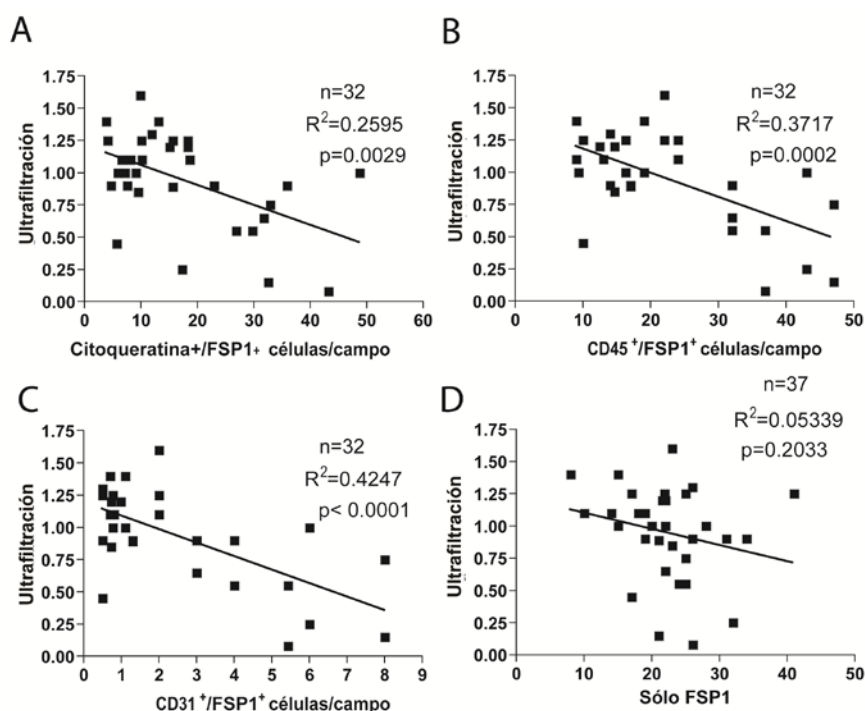


Figura 50. Correlación Lineal entre la ultrafiltración y las distintas poblaciones de fibroblastos, presentes en el peritoneo parietal. Regresión de Spearman, $n=32$.

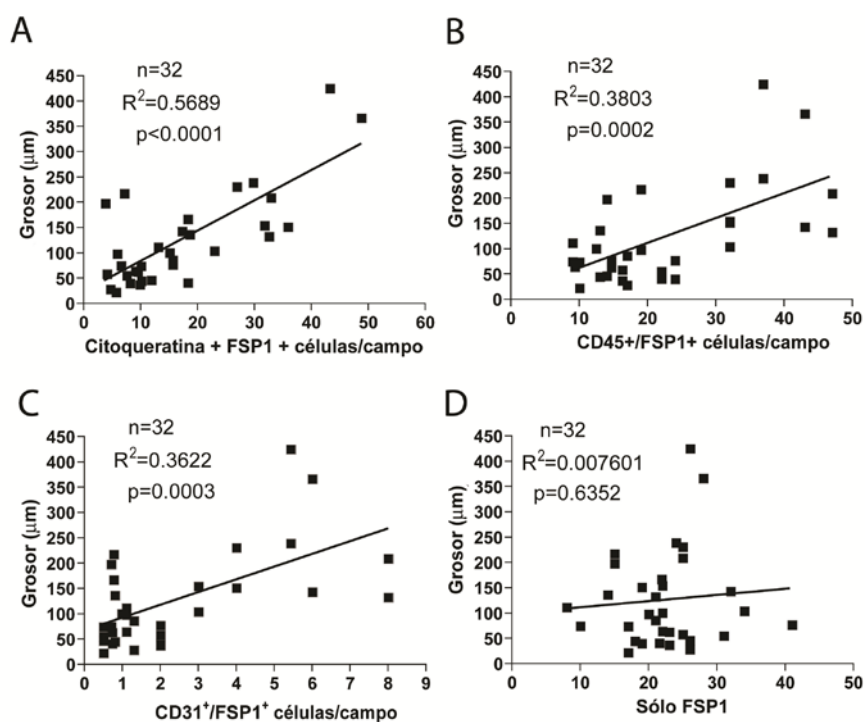


Figura 51. Correlación Lineal entre la fibrosis y las distintas poblaciones de fibroblastos, presentes en el peritoneo parietal. Regresión de Spearman, $n=32$.

8. CONCLUSIONES

- El equilibrio entre el fenotipo epitelial y mesenquimal de las células mesoteliales se encuentra regulado por los niveles de TGF- β 1 y BMP-7.
- El BMP-7 es capaz de impedir la TEM de las células mesoteliales y el deterioro de la membrana peritoneal en un modelo de exposición a líquido de diálisis.
- La sobre-expresión de Cox-2 es una consecuencia de la TEM.
- La inhibición de COX-2 es capaz de reducir el daño peritoneal, a través de la reducción de la inflamación.
- La rosiglitazona ejerce una acción protectora sobre el peritoneo expuesto a líquido de diálisis. El mecanismo de actuación es mediante el aumento del número de células T reguladoras y la reducción de AGEs.
- Los fibroblastos que se encuentran en el peritoneo dañado, como consecuencia a la exposición a líquido de diálisis, presentan, al menos, un origen: epitelial (células mesoteliales), hematopoyético, endotelial y de fibroblastos residentes.
- El bloqueo de TGF- β 1 es capaz de disminuir el deterioro peritoneal causado por la diálisis peritoneal, disminuyendo el número de fibroblastos residentes de todos los orígenes.
- La acción del bloqueo de TGF- β 1 es más acusada, con respecto a la TEM, que con respecto a otros procesos que originan fibroblastos activos

9. BIBLIOGRAFÍA

Abreu, J.G.; Keptura, N.I.; Reversade, B y De Robertis, E.M.(2002) Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell. Biol.* 4: 599–604.

Aguilera, A.; Yáñez-Mo, M.; Selgas, R.; Sánchez-Madrid, F.y López-Cabrera, M. (2005) Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 6: 262-268.

Aramwit, P.; Supasynndh, O. y Sriboonruang, T. (2008) Pharmacokinetics of singledose rosiglitazone in chronic ambulatory peritoneal dialysis patients. *J. Clin. Pharm. Ther.* 33:685–690.

Aroeira, L.S.; Aguilera, A.; Sánchez-Tomero, J.A.; Bajo, M.A.; Del Peso, G.; Jiménez- Heffernan, J.A.; Selgas, R.y López-Cabrera, M. (2007) Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 2004-13.

Aroeira, L.S.; Aguilera, A.; Selgas, R.; Ramírez- Huesca, M.; Pérez-Lozano, M.L.; Cirugeda, A.; Bajo, M.A.; Del Peso, G.; Sánchez-Tomero, J.A.; Jiménez-Heffernan, J.A. y López-Cabrera, M. (2005) Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: Role of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Kidney. Dis.* 46: 938–948.

Aroeira, L.S.; Lara-Pezzi, E.; Loureiro, J.; Aguilera, A.; Ramírez-Huesca, M.; González-Mateo, G.; Pérez-Lozano, M.L.; Albar-Vizcaíno, P.; Bajo, M.A.; Del Peso, G.; Sánchez-Tomero, J.A.; Jiménez-Heffernan, J.A.; Selgas, R.y López-Cabrera, M. (2009) Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(3):582-92.

Aroeira, L.S.; Loureiro, J.; González-Mateo, G.T.; Fernández-Millara, V.; Del Peso, G.; Sánchez-Tomero, J.A.; Ruiz-Ortega, M.; Bajo, M.A.; López-Cabrera, M. y Selgas, R. (2008) Characterization of epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells in a mouse model of chronic peritoneal exposure to high glucose dialysate. *Perit. Dial. Int.* 28 Suppl 5:S29-33.

Attisano, L.; Wrana, J.L. (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 296: 1646–1647.

Axelsson, J.; Carrero, J.J.; Avesani, C.M.; Heimbürger, O.; Lindholm, B. y Stenvinkel, P. (2006) Adipokine signaling in the peritoneal dialysis patient. *Contrib. Nephrol.* 150: 166–173.

Bellini, A. y Mattoli, S. (2007) The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab. Invest.* 87: 858-870.

- Bensinger, S.J. y Tontonoz, P. (2008) Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 454:470–477.
- Bensinger; S.J. y Tontonoz, P. (2008) Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 454:470–477.
- Bonner, J.C.; Rice, A.B.; Ingram, J.L.; Moomaw, C.R.; Nyska, A.; Bradbury, A.; Sessoms, A.R.; Chulada, P.C.; Morgan, D.L.; Zeldin, D.C. y Langenbach, R. (2002) Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 161: 459–470.
- Border, W.A. y Noble, N.A. (1994) Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N. Engl. Med.* 331: 1286-1292.
- Boulanger, E.; Grossin, N.; Wautier, M.P.; Tamma, R. y Wautier, J.L. (2007) Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation. *Kidney. Int.* 71:126–133.
- Boulanger, E.; Wautier, M.P.; Gane, P.; Mariette, C.; Devuyst, O. y Wautier, J.L. (2004) The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19:2208–2216.
- Boulanger, E.; Wautier, M.P.; Wautier, J.L.; Boval, B.; Panis, Y.; Wernert, N.; Danze, P.M. y Dequiedt, P. (2002) AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney. Int.*; 61:148–156.
- Bozkurt, D.; Taskin, H.; Sezak, M.; Biçak, S.; Sen, S.; Ok, E. y Duman, S. (2008) Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor agonist, improves peritoneal alterations resulting from an encapsulated peritoneal sclerosis model. *Adv. Perit. Dial.* 24:32–38.
- Castrillo, A. y Tontonoz, P. (2004) Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20:455–480.
- Chagnac, A.; Herskovitz, P.; Weinstein, T.; Elyashiv, S.; Hirsh, J.; Hammel, I. y Gafer, U. (1999) The peritoneal membrane in peritoneal dialysis patients: estimation of its functional surface area by applying stereologic methods to computerized tomography. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 342–346.
- Cheng, H.F.; Wang, C.J.; Moeckel, G.W.; Zhang, M.Z.; McKanna, J.A. y Harris, R.C. (2002) Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int.* 62: 929–939.
- Clark, R.B.; Bishop-Bailey, D.; Estrada-Hernandez, T.; Hla, T.; Puddington, L. y Padula, S.J. (2000) The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J. Immunol.* 164:1364–1371.

Conti, G.; Amore, A.; Cirina, P.; Peruzzi L, Balegno, S. y Coppo, R. (2008) Glycated adducts induce mesothelial cell transdifferentiation: role of glucose and icodextrin dialysis solutions. *J. Nephrol.* 21:426–437.

Daynes, R.A. y Jones, D.C. (2002) Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2(10):748-59.

De Vriese, A.S.; Tilton, R.G.; Mortier, S. y Lameire, N.H. (2006) Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21:2549–2555.

Del Peso, G.; Jiménez-Heffernan, J.A.; Bajo, M.A.; Aroeira, L.S.; Aguilera, A.; Fernández-Perpén, A.; Cirugeda, A.; Castro, M.J.; De Gracia, R.; Sánchez-Villanueva, R.; Sánchez-Tomero, J.A.; López-Cabrera, M. y Selgas, R. (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells is an early event during peritoneal dialysis and is associated with high peritoneal transport. *Kidney. Int. Suppl.* (108):S26-33.

Desmouliere, A.; Geinoz, A.; Gabbiani, F. y Gabbiani, G. (1993) Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblast. *J. Cell. Biol.* 122: 103-111.

Devuyst, O.; Margetts, P.J. y Topley, N. (2010) The pathophysiology of the peritoneal membrane. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21: 1077-1085.

Di Paolo, N. y Sacchi, G. (2000) Atlas of peritoneal histology. *Perit. Dial. Int.* 20[Suppl 3]: S5–S96.

Dotor, J.; López-Vázquez, A.B.; Lasarte, J.J.; Sarobe, P.; García-Granero, M.; Riezu-Boj, J.I.; Martínez, A.; Feijoó, E.; López-Sagaseta, J.; Hermida, J.; Prieto, J. y Borrás-Cuesta, F. (2007) Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor β 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine.* 39: 106-115.

Douma, C.E.; De Waart, D.R.; Zemel, D.; Struijk, D.G. y Krediet, R.T. (2001) Prostaglandin inhibition by intraperitoneal indomethacin has no effect on peritoneal permeability during stable CAPD. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 803–808.

Thompson, E.W. y Newgreen, D.F. (2005) Carcinoma Invasion and Metastasis: A Role for Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer. Res.* 15;65(14):5991-5; discussion 5995.

Ezquerro, I.J.; Lasarte, J.J.; Dotor, J.; Castilla-Cortázar, I.; Bustos, M.; Peñuelas, I.; Blanco, G.; Rodríguez, C.; Lechuga, M.; Greenwel, P.; Rojkind, M.; Prieto, J. y Borrás-Cuesta, F. (2003) A synthetic peptide from transforming growth factor β type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine*, 22: 12-20.

Fenton, S.S.; Schaubel, D.E.; Desmeules, M.; Morrison, H.I.; Mao, Y.; Copleston, P.; Jeffery, J.R. y Kjellstrand, C.M. (1997) Hemodialysis versus peritoneal dialysis: A comparison of adjusted mortality rates. *Am. J. Kidney. Dis.* 30:334–342.

Ferguson, M.W. y O’Kane, S. (2004) Scar-free healing: From embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359: 839–850.

Flessner, M. (1996) Small-solute transport across specific peritoneal tissue surfaces in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 225–233.

Fosang, A.J.; Hey, N.J.; Carney, S.L. y Hardingham, T.E. (1990) An ELISA plate-based assay for hyaluronan using biotinylated proteoglycan G1 domain (HA-binding region). *Matrix.* 10: 306–313.

Gangji, A.S.; Brimble, K.S. y Margetts, P.J. (2009) Association between markers of inflammation, fibrosis and hypervolemia in peritoneal dialysis patients. *Blood. Purif.* 28: 354-8.

Garcia-Lopez, E.; Carrero, J.J.; Suliman, M.E.; Lindholm, B. y Stenvinkel, P. (2007) Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* 27[Suppl 2]: S205–S209.

Gately, S. y Li, W.W. (2004) Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: A target for antiangiogenic therapy. *Semin. Oncol.* 31: 2–11, 2004.

Giatromanolaki, A.; Kotsiou, S.; Koukourakis, M.I. y Sivridis, E. (2007) Angiogenic factor expression in hepatic cirrhosis. *Mediators. Inflamm.* 67187.

Gokal, R.; Khanna, R.; Krediet, R.T. y Norph, K.D. (2000). *The Textbook of Peritoneal Dialysis*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Goldberg, R.B.; Kendall, D.M.; Deeg, M.A.; Buse, J.B.; Zagar, A.J.; Pinaire, J.A.; Tan, M.H.; Khan, M.A.; Perez, A.T.; Jacober, S.J. y GLAI Study Investigators. (2005) A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care.* 28:1547–1554.

González-Mateo, G.T.; Loureiro, J.; Jiménez-Hefferman, J.A.; Bajo, M.A.; Selgas, R.; López-Cabrera, M. y Aroeira, L.S. (2009) Chronic Exposure of Mouse Peritoneum to Peritoneal Dialysis Fluid: Structural and Functional Alterations of the Peritoneal Membrane. *Perit. Dial. Int.* 29: 227 - 230.

Guo, H.; Leung, J.C.; Lam, M.F.; Chan, L.Y.; Tsang, A.W.; Lan, H.Y. y Lai, K.N. (2007) Smad7 transgene attenuates peritoneal fibrosis in uremic rats treated with peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol*, 18: 2689-2703.

Harris, R.C. y Breyer, M.D. (2006) Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 236–245.

Hekking, L.H.; Zareie, M.; Driesprong, B.A.; Faict, D.; Welten, A.G.; De Greeuw, I.; Schadee-Eestermans, I.L.; Havenith, C.E.; Van den Born, J.; Ter Wee, P.M. y Beelen, R.H. (2001) Better preservation of peritoneal morphologic features and defense in rats after long-term exposure to a bicarbonate/lactate-buffered solution. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2775–2786.

Hermida, N.; López, B.; González, A.; Dotor, J.; Lasarte, J.J.; Sarobe, P.; Borrás-Cuesta, F. y Díez, J. (2009) A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 81: 601-609.

Hirahara, I.; Ishibashi, Y.; Kaname, S.; Kusano, E. y Fujita, T. (2009) Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24:437–447.

Hontecillas, R. y Bassaganya-Riera, J. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4+ T cell-mediated protection against colitis. *J Immunol.* 178:2940–2949.

Hruska, K.A.; Guo, G.; Wozniak, M.; Martin, D.; Miller, S.; Liapis, H.; Loveday, K.; Klahr, S.; Sampath, T.K. y Morrissey, J. (2000) Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 279: F130–F143.

Iglesias, P. y Díez, J.J. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in renal disease. *Eur. J. Endocrinol.* 154:613–621.

Iwano, M. Plieth, D. Danoff, T.M.; Xue, C.; Okada, H. y Neilson, E.G. (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110: 341-350.

Jiménez-Heffernan, J.A.; Aguilera, A.; Aroeira, L.S.; Lara-Pezzi, E.; Bajo, M.A.; Del Peso, G.; Ramírez, M.; Gamallo, C.; Sánchez-Tomero, J.A.; Álvarez, V.; López-Cabrera, M. y Selgas, R. (2004) Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch.* 444: 247–256.

Kalluri, R. y Neilson, E.G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112: 1776–1784.

Kapp, J.A.; Honjo, K.; Kapp, L.M.; Xu, X.; Cozier, A. y Bucy, R.P. (2006) TCR transgenic CD8+ T cells activated in the presence of TGFbeta express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *Int. Immunol.* 18:1549–1562.

Kawai, T.; Masaki, T.; Doi, S.; Arakawa, T.; Yokoyama, Y.; Doi, T.; Kohno, N. y Yorioka, N. (2009) PPAR-g agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-β. *Lab. Invest.* 89:47–58.

Khanapure, S.P.; Garvey, D.S.; Janero, D.R. y Letts, L.G. (2007) Eicosanoids in inflammation: Biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* 7: 311–340.

Ko GJ, Kang YS, Han SY, et al (2008). Pioglitazone attenuates diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23:2750–2760.

Krediet, R.T. (1999) The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney. Int.* 55: 341–356.

Krediet, R.T.; Lindholm, B. y Rippe, B. (2000) Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit. Dial. Int.* 20[Suppl 4]: S22–S42.

Krediet, R.T.; Zemel, D.; Imholz, A.L. y Struijk, D.G. (1994) Impact of surface area and permeability on solute clearances. *Perit. Dial. Int.* 14 (suppl. 3): S70–S77.

Lai, K.N.; Lai, K.B.; Lam, C.W.; Chan, T.M.; Li, F.K. y Leung, J.C. (2000) Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney. Dis.* 35: 644–652.

Lai, K.N.; Lai, K.B.; Lam, C.W.; Chan, T.M.; Li, F.K. y Leung, J.C. (2000) Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney. Dis.* 35: 644–652.

Lai, K.N.; Tang, S.C. y Leung, J.C. (2007) Mediators of inflammation and fibrosis. *Perit. Dial. Int.* 27[Suppl 2]: S65–S71.

Leung, J.C.; Chan, L.Y.; Tam, K.Y.; Tang, S.C.; Lam, M.F.; Cheng, A.S.; Chu, K.M. Y Lai, K.N. (2009) Regulation of CCN2/CTGF and related cytokines in cultured peritoneal cells under conditions simulating peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24: 458–469.

Leung, J.C.; Chan, L.Y.; Tang, S.C.; Chu, K.M. Y Lai, K.N. (2006) Leptin induces TGF-beta synthesis through functional leptin receptor expressed by human peritoneal mesothelial cell. *Kidney. Int.* 69: 2078–2086.

Li, J.; Qu, X. Y Bertram, J.F. (2009) Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am. J. Pathol.*; 175:1380-1388.

Li, Y.; Wen, X.; Spataro, B.C.; Hu, K.; Dai, C. Y Liu, Y. (2006) Hepatocyte growth factor is a downstream effector that mediates the antifibrotic action of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17:54–65.

Lipkin, G.W.; Forbes, M.A.; Cooper, E.H. Y Turney, J.H. (1993) Hyaluronic acid metabolism and its clinical significance in patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 8(4):357-60.

Liu, H.; Peng, Y.; Liu, F.; Li, J.; Chen, X.; Liu, Y. Y Zhang, H. (2007) A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases transforming growth factor-beta1 synthesis and matrix production in human peritoneal mesothelial cells. *Cell. Biol. Int.* 31: 508–515.

Liu, Y. (2004) Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: Pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 1–12.

López-Novoa, J.M. y Nieto, M.A. (2009) Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO. Mol. Med.* 1: 303-314.

Loureiro, J.; Schilte, M.; Aguilera, A.; Albar-Vizcaíno, P.; Ramírez-Huesca, M.; Pérez-Lozano, M.L.; González-Mateo, G.; Aroeira, L.S.; Selgas, R.; Mendoza, L.; Ortiz, A.; Ruíz-Ortega, M.; Van den Born, J.; Beelen, R.H. y López-Cabrera, M. (2010) BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25(4):1098-108.

Luschka, H. (1851) *Die Structure der serosen haute des menschen.* Tubingen.

Mandl-Weber, S.; Cohen, C.D.; Haslinger, B.; Kretzler, M. y Sitter, T. (2002) Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney. Int.* 61(2):570-8.

Margetts, P.J. y Bonniaud, P. (2003) Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit. Dial. Int.* 23:530–541.

Margetts, P.J.; Bonniaud, P.; Liu, L.; Hoff, C.M.; Holmes, C.J.; West-Mays, J.A. y Kelly, M.M. (2005) Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 425-436.

Margetts, P.J.; Kolb, M.; Galt, T.; Hoff, C.M.; Shockley, T.R. y Gauldie, J. (2001) Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2029-2039.

Martin, P.; D'Souza, D.; Martin, J.; Grose, R.; Cooper, L.; Maki, R. y McKercher, S.R. (2003) Wound healing in the PU.1 null mouse: Tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr. Biol.* 13: 1122–1128.

Martin, P. y Leibovich, S.J. (2005) Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends. Cell. Biol.* 15: 599–607.

Massagué, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 169–178.

Masunaga, Y.; Muto, S.; Asakura, S.; Akimoto, T.; Homma, S.; Kusano, E. y Asano, Y. (2003) Ascites from patients with encapsulating peritoneal sclerosis augments NIH/3T3 fibroblast proliferation. *Ther. Apher. Dial.* 7: 486–493.

Maynard, C.L. y Weaver, C.T. (2008) Diversity in the contribution of IL-10 to T-cell mediated immune regulation. *Immunol. Rev.* 226:219–233.

Merrihew, C.; Soeder, S.; Rueger, D.C.; Kuettner, K.E. y Chubinskaya, S. (2003) Modulation of Endogenous osteogenic protein-1 (OP-1) by interleukin-1 in adult human articular cartilage. *J. Bone. Joint. Surg. Am.* 85-A: 67–74.

Mizutani, M.; Ito, Y.; Mizuno, M.; Nishimura, H.; Suzuki, Y.; Hattori, R.; Matsukawa, Y.; Imai, M.; Oliver, N.; Goldschmeding, R.; Aten, J.; Krediet, R.T.; Yuzawa, Y. y Matsuo, S. (2010) Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 298: F721–733.

Nevado, J.; Peiro, C.; Vallejo, S.; El-Assar, M.; Lafuente, N.; Matesanz, N.; Azcutia, V.; Cercas, E.; Sanchez-Ferrer, C.F. y Rodriguez-Manas, L. (2005) Amadori adducts activate nuclear factor-kappaB-related proinflammatory genes in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 146: 268–279.

Nguyen, T.Q.; Roestenberg, P.; Van Nieuwenhoven, F.A.; Bovenschen, N.; Li, Z.; Xu, L.; Oliver, N.; Aten, J.; Joles, J.A.; Vial, C.; Brandan, E.; Lyons, K.M. y Goldschmeding, R. (2008) CTGF inhibits BMP-7 signaling in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19: 2098–2107.

Nie, J.; Dou, X.; Hao, W.; Wang, X.; Peng, W.; Jia, Z.; Chen, W.; Li, X.; Luo, N. Lan, H.Y. y Yu, X.Q. (2007) Smad7 gene transfer inhibits peritoneal fibrosis. *Kidney. Int.* 72: 1336–1344.

Nolph, K.D.; Sorkin, M.; Rubin, J.; Arfania, D.; Prowant, B.; Fruto, L.; Kennedy, D. (1980) Continuous ambulatory peritoneal dialysis: three-year experience at one center. *Ann. Intern. Med.* 92: 609–613.

Patel, P.; Sekiguchi, Y.; Oh, K.H.; Patterson, S.E.; Kolb, M.R. y Margetts, P.J. (2010) Smad3-dependent and -independent pathways are involved in peritoneal membrane injury. *Kidney. Int.* 77: 319–328.

Pecoits-Filho, R.; Araujo, M.R.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P.; Abensur, H.; Romão, J.E.; Marcondes, M.; De Oliveira, A.H. y Noronha, I.L. (2002) Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17: 1480–1486.

Pistrosch, F.; Herbrig, K.; Kindel, B.; Passauer, J.M.; Fischer, S. y Gross, P. (2005) Rosiglitazone improves glomerular hyperfiltration, renal endothelial dysfunction, and microalbuminuria of incipient diabetes nephropathy in patients. *Diabetes.* 54:2206–2211.

Popovich, R.P.; Moncrief, J.W.; Decherd, J.F.; Bomar, J.B. y Pyle, W.K. (1976) Preliminary verification of the low dialysis clearance hypothesis via a novel equilibrium peritoneal dialysis technique. *Absts. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 5: 64.

Putiloff, P.V. (1886) Materials for the study of the laws of growth of the human body in relation to the surface areas of different systems: the trial on Russian subjects of planigraphic anatomy as a mean of exact anthropometry. Presented at the Siberian branch of the Russian Geographic Society.

Ricote, M.; Li, A.C.; Willson, T.M.; Kelly, C.J. y Glass, C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391:79–82.

Rizos, C.V.; Elisaf, M.S.; Mikhailidis, D.P. y Liberopoulos, E.N. (2009). How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice? *Expert. Opin. Drug. Saf.* 8:15–32.

Robinson, B. (1897) *The Peritoneum*. Chicago, IL: WT Keener, p. 13.

Rosen, E.D. y Spiegelman, B.M. (2001) PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276: 37731–37734.

Sakai, N.; Wada, T.; Yokoyama, H.; Lipp, M.; Ueha, S.; Matsushima, K. y Kaneko, S. (2006) Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 14098–14103.

Sakamoto, N.; Sugimura, K.; Kawashima, H.; Tsuchida, K.; Takemoto, Y.; Naganuma, T.; Tatsumi, S.; Nakatani, T. (2005) Influence of glucose and inflammatory cytokines on TGF-beta1 and CTGF mRNA expressions in human peritoneal mesothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 15: 907–911.

Sandoval, P.; Loureiro, J.; González-Mateo, G.; Pérez-Lozano, M.L.; Maldonado-Rodríguez, A.; Sánchez-Tomero, J.A.; Mendoza, L.; Santamaría, B.; Ortiz, A.; Ruíz-Ortega, M.; Selgas, R.; Martín, P.; Sánchez-Madrid, F.; Aguilera, A. y López-Cabrera, M. (2010) PPAR-γ agonist rosiglitazone protects peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage. *Lab. Invest.* 90: 1517–1532.

Santiago, B.; Gutierrez-Cañas, I.; Dotor, J.; Palao, G.; Lasarte, J.J.; Ruiz, J.; Prieto, J.; Borrás-Cuesta, F. y Pablos J.L. (2005) Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* 125: 450–455.

Schwenger, V.; Morath, C.; Salava, A.; Amann, K.; Seregin, Y.; Deppisch, R.; Ritz, E.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.P. y Zeier, M. (2006) Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced glycation end-products. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17:199–207.

Selgas, R.; Del Peso, G.; Bajo, M.A.; Castro, M.A.; Molina, S.; Cirugeda, A.; Sánchez-Tomero, J.A.; Castro, M.J.; Alvarez, V.; Corbí, A. y Vara, F. (2000) Spontaneous VEGF production by cultured peritoneal mesothelial cells from patients on peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* Nov-Dec; 20(6):798-801.

Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R (2003). Regulation of cyclooxygenase- 2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 278: 34834–34844.

Sherif, A.M.; Nakayama, M.; Maruyama, Y.; Yoshida, H.; Yamamoto, H.; Yokoyama, K. y Kawakami, M. (2006) Quantitative assessment of the peritoneal vessel density and vasculopathy in CAPD patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 1675–1681.

Shi, Y. y Massagué, J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113: 685-700.

Sitter, T.; Haslinger, B.; Mandl, S.; Fricke, H.; Held, E. y Sellmayer, A. (1998) High glucose increases prostaglandin E2 synthesis in human peritoneal mesothelial cells: role of hyperosmolarity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 2005–2012.

Steinhauer, H.B. y Schollmeyer, P. (1986) Prostaglandin-mediated loss of proteins during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 29: 584–590.

Strippoli, R.; Benedicto, I.; Pérez-Lozano, M.L.; Cerezo, A.; López-Cabrera, M. y Del Pozo, M.A. (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF-kappaB/Snail1 pathway. *Dis. Model. Mech.* 1: 264–274.

Sun, Y.; Zhu, F.; Yu, X.; Nie, J.; Huang, F.; Li, X.; Luo, N.; Lan, H.Y. y Wang, Y. (2009) Treatment of established peritoneal fibrosis by gene transfer of Smad7 in a rat model of peritoneal dialysis. *Am. J. Nephrol.* 30: 84-94.

Szeto, C.C.; Chow, K.M.; Kwan, B.C.; Lai, K.B.; Chung, K.Y.; Leung, C.B. y Li, P.K. (2008) The relationship between bone morphogenic protein-7 and peritoneal transport characteristics. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23: 2989–2994.

Szeto, C.C.; Lai, K.B.; Chow, K.M.; Szeto, C.Y.; Wong, T.Y. y Li, P.K. (2005). Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of connective tissue growth factor and vascular endothelial growth factor by peritoneal mesothelial cells. *Nephron. Exp. Nephrol.* 99: e95–e104.

Tenckhoff, H. y Schechter, H. (1968) A bacteriologically safe peritoneal access device for repeated dialysis. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 14: 181–187.

Ter Wee, P.M. y Van Ittersum, F.J. (2007) The new peritoneal dialysis solutions: friends only, or foes in part?. *Nat. Rev. Neph.* 3:604-612.

Thiery, J.P.; Acloque, H.; Huang, R.Y. y Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139(5): 871-90.

Thiery, J.P. y Sleeman J.P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 131–142.

Toblli, J.E.; Ferrini, M.G.; Cao, G.; Vernet, D.; Angerosa, M. y González-Cadavid, N.F. (2009). Antifibrotic effects of pioglitazone on the kidney in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24:2384–2391.

Topley, N.; Liberek, T.; Davenport, A.; Li, F.K.; Fear, H. y Williams, J.D. (1996) Activation of inflammation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. *Kidney Int. Suppl.* 56: S17–S21.

Topley, N.; Liberek, T.; Davenport, A.; Li, F.K.; Fear, H. y Williams, J.D. (1996) Activation of inflammation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. *Kidney Int. Suppl.* 56: S17–S21.

Tunyogi-Csapo, M.; Koreny, T.; Vermes, C.; Galante, J.O.; Jacobs, J.J. y Glant, T.T. (2007). Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis. *J. Orthop. Res.* 25: 1378–1388.

Turini, M.E. y DuBois, R.N. (2002) Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 53: 35–57.

Vargha, R.; Endemann, M.; Kratochwill, K.; Riesenhuber, A.; Wick, N.; Krachler, A.M.; Malaga-Dieguez, L. y Aufricht, C. (2006). Ex vivo reversal of in vivo transdifferentiation in mesothelial cells grown from peritoneal dialysate effluents. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 2943–2947.

Visser, C.E.; Tekstra, J.; Brouwer-Steenbergen, J.J.; Tuk, C.W.; Boorsma, D.M.; Sampat-Sardjoepersad, S.C.; Meijer, S.; Krediet, R.T. y Beelen, R.H. (1998) Chemokines produced by mesothelial cells: huGRO-alpha, IP-10, MCP-1 and RANTES. *Clin. Exp. Immunol.* 112: 270–275.

Vukicevic, S.; Basic, D.; Rogic, D.; Basic, N.; Shih, M.S.; Shepard, A.; Jin, D.; Dattatreyamurty, B.; Jones, W.; Dorai, H.; Ryan, S.; Griffiths, D.; Maliakal, J.; Jelic, M.; Pastorcic, M.; Stavljenic, A. y Sampath, T.K. (1998) Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J. Clin. Invest.* 102: 202–214.

Wang, S.; Chen, Q.; Simon, T.C.; Strebeck, F.; Chaudhary, L.; Morrissey, J.; Liapis, H.; Klahr, S. y Hruska, K.A. (2003) Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 63: 2037–2049.

Wang, T.; Chen, Y.G.; Ye, R.G.; Li, S.L.; Li, H.Q. y Chen, Y.X. (1995) Effect of glucose on TGF-beta 1 expression in peritoneal mesothelial cells. *Adv. Perit. Dial.* 11: 7–10.

Wang, X.; Nie, J.; Jia, Z.; Feng, M.; Zheng, Z.; Chen, W.; Li, X.; Peng, W.; Zhang, S.; Sun, L.; Mao, H.; Lan, H.Y. y Yu, X. (2010) Impaired TGF-beta signalling enhances peritoneal inflammation induced by E. coli in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25: 399-412.

Wen, Y.; Gu, J.; Li, S.L.; Reddy, M.A.; Natarajan, R. y Nadler, J.L. (2006) Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages. *Endocrinology.* 147: 2518–2525.

Wilborn, J.; Crofford, L.J.; Burdick, M.D.; Kunkel, S.L.; Strieter, R.M. y Peters-Golden, M. (1995) Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 95: 1861–1868.

Williams, J.D.; Craig, K.J.; Topley, N.; Von Ruhland, C.; Fallon, M.; Newman, G.R.; Mackenzie, R.K. y Williams, G.T. (2002) Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:470-9.

Wohlfert, E.A.; Nichols, F.C.; Nevis, E. y Clark, R.B. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPARgamma-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol.* 178:4129–4135.

Wrana, J.L. (2000) Regulation of Smad activity. *Cell.* 100: 189–192.

Xu, J.; Lamouille, S.; Derynck, R. (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell. Res.* 19:156-172.

Yamamoto, H.; Kondo, M.; Nakamori, S.; Nagano, H.; Wakasa, K.; Sugita, Y.; Chang-De, J.; Kobayashi, S.; Damdinsuren, B.; Dono, K.; Umeshita, K.; Sekimoto, M.; Sakon, M.; Matsuura, N. y Monden, M. (2003) JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology.* 125: 556–571.

Yañez-Mo, M.; Lara-Pezzi, E.; Selgas, R.; Ramírez-Huesca, M.; Domínguez-Jiménez, C.; Jiménez-Heffernan, J.A.; Aguilera, A.; Sánchez-Tomero, J.A.; Bajo, M.A.; Álvarez, V.; Castro, M.A.; Del Peso, G.; Cirujeda, A.; Gamallo, C.; Sánchez-Madrid, F. y López-Cabrera, M. (2003) Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N. Engl. J. Med.* 348: 403–413.

Yang, A.H.; Chen, J.Y. y Lin, J.K. (2003) Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int.* 63: 1530–1539.

Yang, A.H.; Huang, S.W.; Chen, J.Y.; Lin, J.K. y Chen, C.Y. (2007) Leptin augments myofibroblastic conversion and fibrogenic activity of human peritoneal mesothelial cells: a functional implication for peritoneal fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:756–762.

Yao, Q.; Ayala, E.R.; Qian, J.Q.; Stenvinkel, P.; Axelsson, J. y Lindholm B. (2007) A combination of a PPAR-gamma agonist and an angiotensin II receptor blocker attenuates proinflammatory signaling and stimulates expression of Smad7 in human peritoneal mesothelial cells. *Clin. Nephrol.* 68:295–301.

Yao, Q.; Pawlaczyk, K.; Ayala, E.R.; Kuzlan, M.; Styszynski, A.; Breborowicz, A.; Heimbürger, O.; Qian, J.; Stenvinkel, P.; Axelsson, J. y Lindholm, B. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists diminish peritoneal functional and morphological changes induced by bioincompatible peritoneal dialysis solution. *Blood Purif.* 24:575–582.

Yao, Q.; Pawlaczyk, K.; Ayala, E.R.; Styszynski, A.; Breborowicz, A.; Heimbürger, O.; Qian, J.Q.; Stenvinkel, P.; Lindholm, B. y Axelsson, J. (2008) The role of the TGF/Smad signaling pathway in peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis solutions. *Nephron. Exp. Nephrol.* 109: e71-78.

Yki-Jarvinen, H. (2004) Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med.* 351:1106–1118.

Yoshimura, A.; Wakabayashi, Y. y Mori, T. (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β . *J. Biochem.* 147: 781-792.

Yu, M.A.; Shin, K.S.; Kim, J.H.; Chung, S.S.; Park, S.H.; Kim, Y.L. y Kang, D.H. (2009) HGF and BMP-7 ameliorate high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelium. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 567–581.

Yu, M.A.; Shin, K.S.; Kim, J.H.; Kim, Y.L.; Chung, S.S.; Park, S.H.; Kim, Y.L. y Kang, D.H. (2009) HGF and BMP-7 ameliorate high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelium. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 567-581.

Zareie, M.; De Vriese, S.; Liesbeth, S; Hekking, P; Ter Wee, P.M.; Casper, G.; Schalkwijk, B.; Driesprong B.A.; Schadee-Eestermans, I.L.; Beelen, R.H.; Lameire, N. y Van den Born, J. (2005) Immunopathological changes in a uraemic rat model for peritoneal dialysis *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 1350 - 1361.

Zarrinkalam, K.H.; Stanley, J.M.; Gray, J.; Oliver, N. y Faull, R.J. (2003) Connective tissue growth factor and its regulation in the peritoneal cavity of peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 64: 331–338.

Zeisberg, E.M.; Potenta, S.E; Sugimoto, H.; Zeisberg, M. y Kalluri, R. (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19: 2282-2287.

Zeisberg, E.M.; Tarnavski, O.; Zeisberg, M.; Dorfman, A.L.; McMullen, J.R.; Gustafsson, E.; Chandraker, A.; Yuan, X.; Pu, W.T.; Roberts, A.B.; Neilson, E.G.; Sayegh, M.H.; Izumo, S. y Kalluri, R. (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 13: 952–961.

Zeisberg, M.; Hanai, J.; Sugimoto, H.; Mammoto, T.; Charytan, D.; Strutz, F. y Kalluri, R. (2003) BMP-7 counteracts TGF-beta1- induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* 9: 964–968.

Zeisberg, M.; Yang, C. y Martino, M.; Duncan, M.B.; Rieder, F.; Tanjore, H. y Kalluri R. (2007) Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 282: 23337–23347.

Zeisberg, M. (2006) Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 568–573.

Zemel, D.; Koomen, G.C.; Hart, A.A.; Ten Berge, I.J.; Struijk, D.G. y Krediet, R.T. (1993) Relationship of TNF-alpha, interleukin-6, and prostaglandins to peritoneal permeability for macromolecules during longitudinal follow-up of peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 686–696.

Zemel, D.; Struijk, D.G.; Dinkla, C.; Stolk, L.M.; Ten Berge, I.J. y Krediet, R.T. (1995) Effects of intraperitoneal cyclooxygenase inhibition on inflammatory mediators in dialysate and peritoneal membrane characteristics during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 126: 204–215.

Zhu, F.; Li, T.; Qiu, F.; Fan, J.; Zhou, Q.; Ding, X.; Nie, J. y Yu, X. (2010) Preventive effect of Notch signaling inhibition by a gamma-secretase inhibitor on peritoneal dialysis fluid-induced peritoneal fibrosis in rats. *Am. J. Pathol.* 176: 650–659.

Zweers, M.M.; De Waart, D.R.; Smit, W.; Struijk, D.G. y Krediet, R.T. (1999) Growth factors VEGF and TGF-beta1 in peritoneal dialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 134: 124–132.

Whitaker, D.; Papadimitriou, J.M. y Walters, M.N. (1980) The mesothelium: techniques for investigating the origin, nature and behaviour of mesothelial cells. *J. Pathol.* 132: 263–271.

10. ANEXO

BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure

Jesús Loureiro¹, Margot Schilte², Abelardo Aguilera¹, Patricia Albar-Vizcaíno¹, Marta Ramírez-Huesca¹, M. Luisa Pérez-Lozano¹, Guadalupe González-Mateo³, Luiz S. Aroeira³, Rafael Selgas³, Lorea Mendoza⁴, Alberto Ortiz⁵, Marta Ruíz-Ortega⁵, Jacob van den Born², Robert H.J. Beelen² and Manuel López-Cabrera^{1,6}

¹Unidad de Biología Molecular, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain ²Departments of Molecular Cell Biology & Immunology, VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands ³Unidad de Investigación and Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain ⁴Pharmakine SL, Derio, Vizcaya, Spain ⁵Unidad de Diálisis and Laboratorio de Investigación Renal y Vascular, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain and ⁶Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Cantoblanco, Madrid, Spain, All the authors from Spain belong to the Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas

Correspondence and offprint requests to: Manuel López-Cabrera; E-mail: mlopez.hlpr@salud.madrid.org

Abstract

Background. During peritoneal dialysis (PD), mesothelial cells (MC) undergo an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and this process is associated with peritoneal membrane (PM) damage. Bone morphogenic protein-7 (BMP-7) antagonizes transforming growth factor (TGF)- β 1, modulates EMT and protects against fibrosis. Herein, we analysed the modulating role of BMP-7 on EMT of MC *in vitro* and its protective effects in a rat PD model.

Methods. Epithelial or non-epithelial MC were analysed for the expression of BMP-7, TGF- β 1, activated Smads, epithelial cadherin (E-cadherin), collagen I, α -smooth muscle cell actin (α -SMA) and vascular endothelial growth factor (VEGF) using standard procedures. Rats were daily instilled with PD fluid with or without BMP-7 during 5 weeks. Histological analyses were carried out in parietal peritoneum. Fibrosis was quantified with van Gieson or Masson's trichrome staining. Vasculature, activated macrophages and invading MC were quantified by immunofluorescence analysis. Quantification of infiltrating leukocytes and MC density in liver imprints was performed by May–Grünwald–Giemsa staining. Hyaluronic acid levels were determined by ELISA.

Results. MC constitutively expressed BMP-7, and its expression was downregulated during EMT. Treatment with recombinant BMP-7 resulted in blockade of TGF- β 1-induced EMT of MC. We provide evidence of a Smad-dependent mechanism for the blockade of EMT. Exposure of rat peritoneum to PD fluid resulted in inflammatory and regenerative responses, invasion of the compact zone by MC, fibrosis and angiogenesis. Administration of BMP-7 decreased the number of invading MC and reduced fibrosis and angiogenesis. In contrast, BMP-7 had no effect on inflammatory and regenerative responses, suggesting that these are EMT-independent, and probably upstream, processes.

Conclusions. Data point to a balance between BMP-7 and TGF- β 1 in the control of EMT and indicate that blockade of EMT may be a therapeutic approach to ameliorate peritoneal membrane damage during PD.

Keywords: bone morphogenic protein-7; epithelial-to-mesenchymal transition; fibrosis; peritoneal dialysis; transforming growth factor- β 1

Introduction

Peritoneal dialysis (PD) is a form of renal replacement that is based on the use of the peritoneum as a semi-permeable membrane across which ultrafiltration and diffusion take place [1,2]. Chronic exposure to non-physiologic PD solutions and episodes of infection cause inflammation and injury to the peritoneal membrane (PM), which progressively undergoes fibrosis, angiogenesis and hyalinizing vasculopathy [3–5]. These morphological alterations are associated with increased small-solute transport rate and with ultrafiltration dysfunction of the PM [3,6,7]. Inflammatory cells and myofibroblasts are considered the main entities responsible for the structural and functional alterations of the peritoneum during long-term PD. In response to PD-induced inflammation and injury, myofibroblasts may originate from mesothelial cells (MC) by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [7–9]. The EMT of MC is a complex process that is characterized by the disruption of intercellular junctions, adoption of a front–back polarity and increased migratory/invasive capacity [7,10]. In addition, transdifferentiated MC acquire the capacity to synthesize pro-inflammatory and pro-angiogenic factors as well as extracellular matrix components (ECM) [11–13], which may contribute to PM worsening [7]. In this context, it has been shown that the presence of

transdifferentiated MC either in the PD effluent or peritoneal tissue of PD patients correlates with high transport rates [11,13,14]. It can be hypothesized that the EMT of MC is an important process in PM dysfunction, and thus, it might be considered a potential target for therapeutic intervention.

Transforming growth factor (TGF)- β 1, a strong pro-fibrotic cytokine [15], appears to be a master molecule in PM structural and functional deterioration [16,17]. In addition, TGF- β 1 is a well-characterized inducer of EMT [8,12,18]. The relevance of TGF- β 1 in both EMT of MC and PM worsening has been further demonstrated in an *in vivo* rat model, which reproduced the structural and functional alterations observed in PD patients [19,20]. It is worthwhile to point out that EMT is a reversible process and that there are molecules, such as bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), that negatively regulate EMT and that promote mesenchymal-to-epithelial transition [21]. BMP-7 is an endogenous protein, belonging to the TGF- β superfamily that prevents and reverses fibrosis in several diseases affecting organs such as the kidney, liver and heart [22–26]. In these diseases, TGF- β 1 and BMP-7 maintain a delicate balance in the control of EMT [21]. TGF- β 1 and BMP-7 bind to specific type I serine–threonine kinase receptors (ALK receptors) and trigger distinct intracellular signalling pathways mediated by Smad proteins. Smad-2 and Smad-3 transduce TGF- β 1 action, whereas Smad-1, Smad-5 and Smad-8 mediate BMP-7 signalling. Smad-4 is common to both pathways [27–29].

Whereas the role of TGF- β 1 in EMT of MC and in PM worsening has been well documented [7,17], the possible protective function of BMP-7 in these processes has not been explored in depth. Vargha *et al.* demonstrated a reversion from mesenchymal-to-epithelial phenotype of effluent-derived MC with fibroblast-like characteristics by BMP-7 [30]. In a recent work, it has been demonstrated that BMP-7 prevented and reversed high-glucose-induced EMT of MC *in vitro* and further decreased peritoneal fibrosis during a peritoneal resting period in PD fluid-exposed rats [31]. However, the ability of BMP-7 to block TGF- β 1-mediated EMT of MC and to prevent PM deterioration during PD fluid exposure has not been addressed. Herein, we demonstrate that MC constitutively express BMP-7 and show activation of BMP-7-specific Smad proteins. During EMT, the expression of BMP-7 is downregulated, but addition of exogenous BMP-7 completely blocks TGF- β 1-induced EMT of MC *in vitro* and ameliorates PM worsening in a rat model of PD fluid exposure. Our results provide evidence that blockade of EMT, by using agonists of the BMP-7 signalling pathway, may be a therapeutic approach to preserve PM integrity during PD.

Materials and methods

Culture of mesothelial cells and treatments

MC were obtained from PD effluents and from omentum samples using the methods described previously [32]. To standardize effluent MC harvesting, the cells were obtained from a long dwell (generally overnight) with a PD fluid containing approximately 2.3% glucose (Dianeal from Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL or Stay Safe from Fresenius Medical Care, Germany). Definition of epithelioid ($n = 9$) and non-epithelioid ($n = 7$) phenotypes of effluent-derived MC was based on cellular morphology of confluent cultures and on the expression levels of epithe-

lial (E-cadherin, cytokeratins) and mesenchymal [α smooth muscle cell actin (α -SMA), collagen I] markers as previously described [8,11,13,32]. Cells were cultured in Earle's M199 medium, supplemented with 20% fetal calf serum, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin and 2% Biogro-2 (Biological Industries, Israel). The purity of effluent and omentum-derived MC cultures was determined by the expression of standard mesothelial markers: intercellular adhesion molecule-1, cytokeratins and calretinin. These MC cultures were negative for von Willebrand factor excluding endothelial cell contamination [32]. The present study is adjusted to the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spain). Written consent was obtained from the PD patients included in this study to use effluent samples. Oral informed consent was obtained from omentum donors submitted to elective surgeries.

To induce EMT *in vitro*, omentum-derived MC were seeded on wells coated with 50 μ g/mL of collagen I (Roche Boehringer GmbH, Mannheim, Germany) and treated for 24, 48 or 72 hours with human-recombinant TGF- β 1 (1 ng/mL) (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN), which has been proven to be a good model of EMT *in vitro* [8,11–13,18]. Where indicated, recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) (Prospec, Rehovot, Israel) was used at a final concentration of 0.5 μ g/mL. This dose of rhBMP-7 was similar to that employed by others [24]. To analyse the effect of glucose degradation products (GDPs) on BMP-7 and TGF- β expression, omentum-derived MC were incubated for 24, 48 or 72 hours with standard PD fluid composed of 4.25 % glucose and buffered with lactate (Stay Safe, Fresenius Medical Care) or low-GDPs solutions composed of 4.25 % glucose and buffered with lactate (Balance, Fresenius Medical Care) diluted one-half with culture medium.

Western blot, enzyme-linked immunoassays and immunofluorescence analysis

For western blotting, MC cultures were lysed in a buffer (1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate) and total protein quantified using a total protein assays kit (Pierce, Cambridge, MA). MC proteins (50 μ g) were resolved in 8–10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membranes, which were blocked with fat-free milk and then incubated with specific antibodies against E-cadherin, collagen I, α -SMA, Smad-1, 5 and 8, *p*-Smad-1, 5 and 8, Smad-2, *p*-Smad-2, Smad-3, *p*-Smad-3, (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), BMP-7 (Santa Cruz biotechnology CA, USA) and β -actin (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Membranes were incubated with goat anti-mouse IgG antibody conjugated with peroxidase (Pharmingen, San Diego, CA) and developed with enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Blot images were acquired with an LAS-1000 charge-coupled device camera (Fujifilm, Cedex, France).

For the detection of TGF- β 1 or VEGF in culture supernatants, the media of MC cultured under the different conditions were replaced, and 18 hours later, supernatants were collected and stored at -80°C until their analysis. The concentrations of TGF- β 1 or VEGF in supernatants were assessed by a standard enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (R&D Systems Inc). The expression of BMP-7 under different conditions was measured in cell lysates by an ELISA-based assay according to Merrihew *et al.* [33] using two anti-BMP-7 antibodies (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan; Santa Cruz Biotechnology CA, USA).

For immunofluorescence analysis, staining with antibodies to *p*-Smad-1, 5 and 8 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) and BMP-7 (Santa Cruz Biotechnology CA, USA) was performed using Alexa-labelled secondary antibodies (BD Biosciences, USA). Cells were fixed for 15 minutes in 4% formaldehyde in PBS, and blocked with 10% horse serum for 60 minutes in PBS with 0.3% Triton X-100. First antibody was incubated in PBS with 0.3 % Triton X-100 for 60 minutes, and then, secondary Alexa-labelled antibody was incubated under same conditions. Finally, the preparations were mounted with a 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear stain (Vectashield; Vector Laboratories). Negative controls for immunofluorescent staining were conducted using 10% rabbit serum instead of primary antibody. Images were analysed by computerized digital image analysis (AnalySIS, Soft Imaging System).

Animals and experimental design of PD fluid exposure

Male Wistar rats (Harlan CPB, Horst, The Netherlands) weighing 250–275 g at the beginning of the experiment were used throughout the study

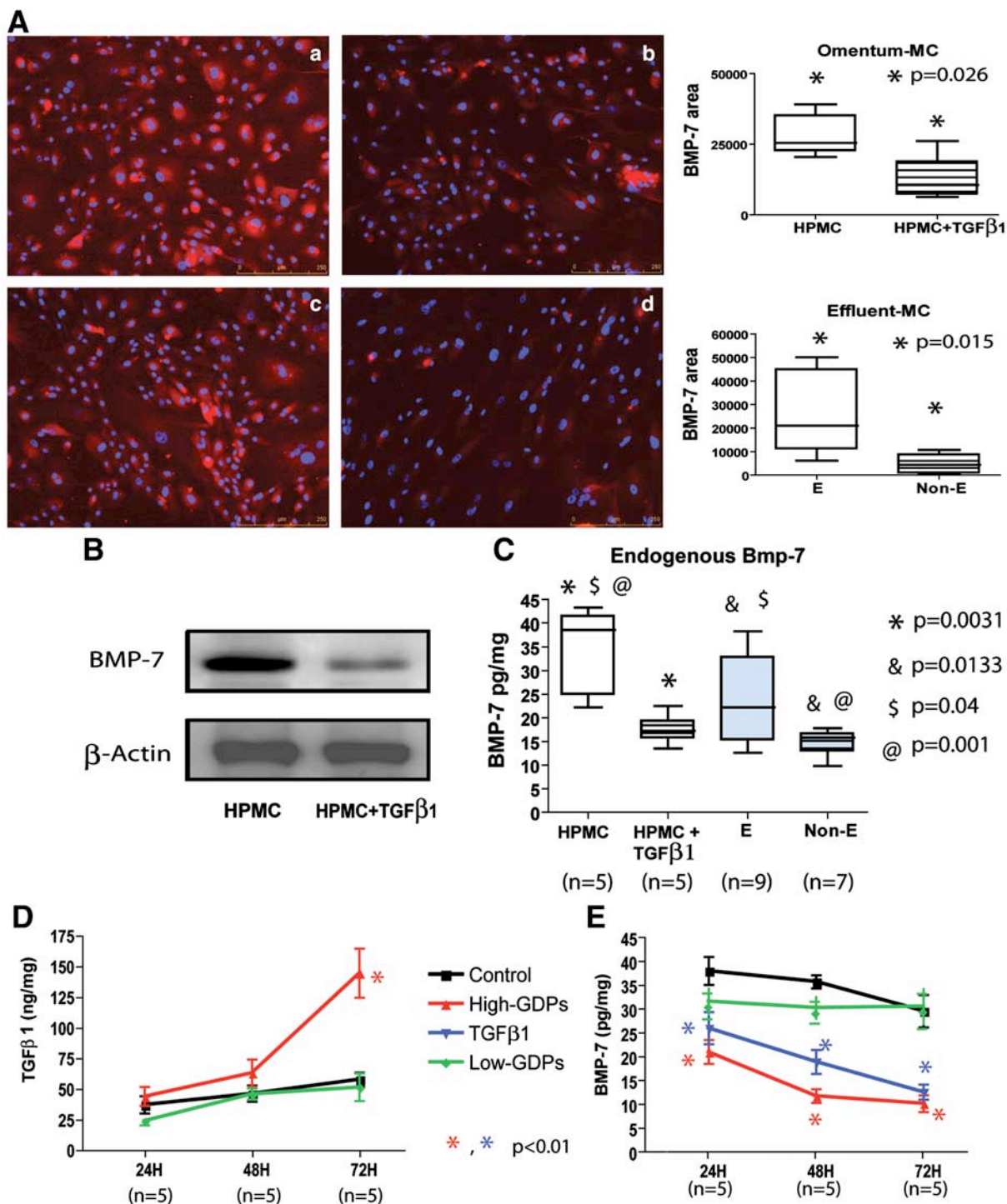


Fig. 1. Downregulation of BMP-7 expression during EMT of MC. (A). Immunofluorescence microscopy shows cytoplasmic staining of BMP-7 in omentum-derived MC (panel a), which is downregulated upon treatment with 1 ng/mL of TGF-β1 during 48 hours (panel b). Effluent-derived MC with epithelioid phenotype display BMP-7 staining (panel c) and MC with non-epithelioid phenotype show decreased BMP-7 expression (panel d). Magnification $\times 400$. The decrease of BMP-7 during *in vitro* and *in vivo* EMT is significant in both cases, as determined by computerized digital image analysis of the percentage of positive area for BMP-7 (right graphs). (B). Analysis of BMP-7 expression by western blot in omentum MC treated or not with TGF-β1 during 48 hours. (C). Analysis of BMP-7 expression by ELISA in untreated omentum MC ($n = 5$), omentum MC treated with TGF-β1 ($n = 5$), epithelioid effluent MC ($n = 9$) and non-epithelioid effluent MC ($n = 7$) shows significant downregulation of this protein during *in vitro* and *in vivo* EMT. (D, E). Omentum-derived MC were incubated for 24, 48 or 72 hours with control medium, standard PD fluid containing high GDPs (High-GDPs) or a solution containing low GDPs (Low-GDPs) diluted one-half with culture medium. Cells were also treated with recombinant TGF-β1 (1 ng/mL). The synthesis of TGF-β1 was measured in culture media supernatant by ELISA, and results are depicted as nanograms per milligrams of total cellular proteins (D). The expression of BMP-7 was measured in cell lysates by ELISA, and results are depicted as picograms per milligrams of total cellular proteins (E). The experiment was repeated five times, and results are presented as mean \pm SD. Box plots represent 25 and 75 percentiles, median, minimum and maximum values. Symbols show statistical differences between groups.

($n = 44$). They were allowed 1 week of acclimatization before the start of the experiment. Animals were housed under conventional laboratory conditions and were given food and water *ad libitum*. Fluids were instilled via a peritoneal catheter connected to an implanted subcutaneous mini access port as previously described [34]. Rats that were not surgically treated and received no fluid instillation, served as control group (Control; $n = 8$). The animals implanted with a peritoneal access port ($n = 36$) received 2 mL of saline with 1 IU/mL heparin to allow wound healing during the first week after surgery. Thereafter, during a 5-week period, 14 rats were instilled daily (one per day) with 10 mL of standard PD fluid (Dianeal® PD4, 3.86% glucose, pH 5.2, Baxter R&D, Utrecht, The Netherlands) (PDF; $n = 14$) [35–38]. The remainder of the animals received daily treatment (one per day) with rhBMP-7 (0.25 mg/kg body weight (BW)) either in 10 mL of PD fluid (PDF + BMP-7; $n = 14$) or in 1 mL saline (Control + BMP-7; $n = 8$) which were both given i.p. via the peritoneal access port. The dose of rhBMP-7 was similar to that employed by others [24]. Drop outs were 0, 6, 2, and 4 for the Control, PDF, PDF + BMP-7 and Control + BMP-7 groups, respectively, being the cause of catheter obstruction with omental wrap. There were no significant differences in weight gain among the different groups. Since the number of rats in the Control + BMP-7 group at the end of the study was only four, insufficient for appropriated statistical analysis, they were employed to study possible side effects (e.g. immune response) derived from rhBMP-7 treatment (Supplementary Figure S1 and Table S1). The experimental design was approved by the Animal Care Committee of the Vrije Universiteit of Amsterdam.

Morphological analysis of peritoneal samples

For histological analyses, specimens of the parietal peritoneum were obtained from the contralateral side to the tip of the implanted catheter. Cryostat sections (7 μ m) were cut and stained with van Gieson or Masson's trichrome (Merck, Darmstadt, Germany) to quantify fibrosis. The thickness of submesothelial tissue was determined by blinded microscope analysis using a metric ocular, and was expressed as the mean of 10 independent measurements for each animal. Frozen sections were stained for immunofluorescence analysis with antibodies to visualize vasculature (CD31) and activated macrophages (ED2) (Serotec, Oxford, UK). Background control staining was performed by incubating secondary antibodies alone (Invitrogen, Carlsbad, USA) (omitting the first antibodies) and proved to be negative. Images were analysed by computerized digital image analysis (AnalySIS, Soft Imaging System). The positive area for CD31 and ED2 was calculated as a percentage of the total area of the tissue. To detect the presence of invading MC that have undergone an EMT, the frozen sections were stained with antibodies specific for cytokeratins and FSP-1 (Dako; Glostrup, Denmark).

Peritoneal leukocyte infiltration, hyaluronic acid content and liver imprint

After 5 weeks of treatment, rats were injected with 30 mL of standard PD fluid into the peritoneal cavity via a direct i.p. catheter (Venflon Pro, BD Medical, New Jersey, USA), under a mixture of Hypnorm (0.05 mL/100 g BW)/Dormicum (0.08 mL/100 g BW) anaesthesia. After 90 minutes, the

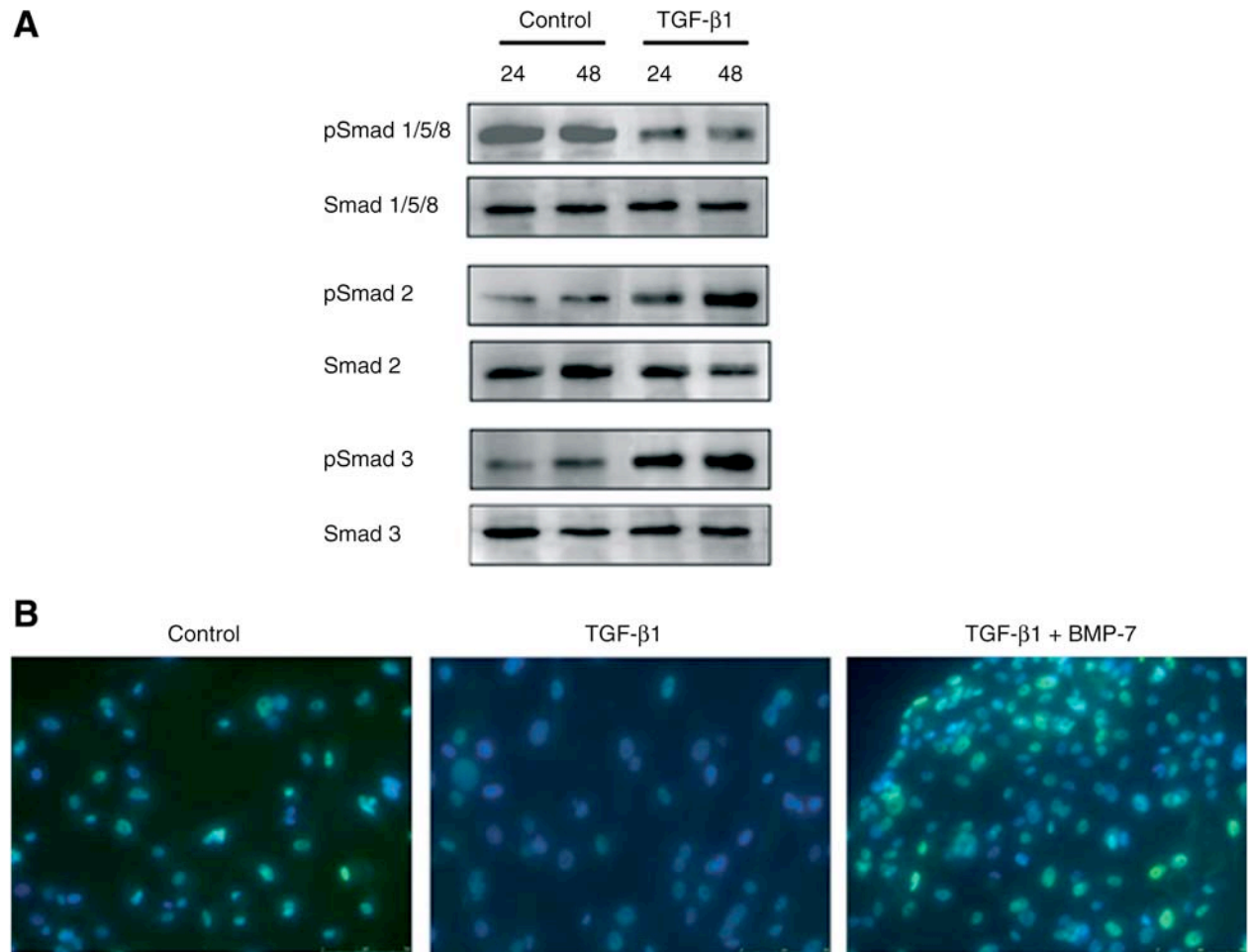


Fig. 2. Inactivation of BMP-7-specific Smad proteins during EMT of MC. (A). Omentum-derived MC were either left untreated or treated with 1 ng/mL of TGF- β 1 for 24 or 48 hours. Western blot analysis shows basal activation (phosphorylation) of the BMP-7-specific Smad 1, 5 and 8, which decreases upon TGF- β 1 treatment at both time points. In contrast, exposure to TGF- β 1 results in enhanced phosphorylation of Smads 2 and 3. (B). Immunofluorescence microscopy shows nuclear staining of activated forms of Smad 1, 5, and 8 in untreated MC (left), which decreases upon treatment with TGF- β 1 during 48 hours (middle). Co-treatment of MC with TGF- β 1 and BMP-7 (0.5 μ g/mL) restores the activation and nuclear translocation of BMP-7-specific Smads (right). The experiment was repeated at least three times, and a representative experiment is shown. Magnification $\times 630$.

PD fluid was drained, and cells were isolated by centrifugation. Cell number and viability was determined by Trypan Blue exclusion. Cytocentrifuge preparations were stained by May–Grünwald–Giemsa, and cell subsets were identified and counted. After PD fluid draining, animals were sacrificed, and tissues were taken to analyse morphological and cellular parameters. The amount of hyaluronic acid (HA) in the supernatant of the peritoneal effluent was determined in an ELISA-based assay according to Fosang *et al.* [39]. Liver imprints of the mesothelial monolayer of the liver were taken with 3% gelatin-coated slides according to the method described before [40] and stained by May–Grünwald–Giemsa. Mesothelial cell density was counted in 15 visual fields and expressed as cells/square millimetre.

Statistical analysis

All data are presented as median and interquartile, except Figures 1C, D and 3 that are given as means \pm SD. Comparisons between data groups were performed using the non-parametric Mann–Whitney rank-sum *U*-test. Linear correlation was determined by Spearman regression (Figures 5C and 6D). $P < 0.05$ was considered statistically significant. We used SPSS 14.5 (Chicago, IL) and GraphPad Prism 4.0 (La Jolla, CA).

Results

BMP-7 is constitutively expressed in MC and downregulated during EMT.

BMP-7 is involved in the modulation of mesenchymal conversion in a wide spectrum of epithelial cells, thus we analysed the expression of BMP-7 in MC and its association with EMT, a key process in PM dysfunction [7]. Omentum-derived MC showed cytoplasmic immunostaining of BMP-7 (Figure 1A, panel a). Treatment of these cells with 1 ng/mL of TGF- β 1 during 48 hours to induce EMT, resulted in a clear downregulation of BMP-7 expression (Figure 1A, panel b). Similarly, effluent-derived MC [32] with epithelioid phenotype displayed BMP-7 expression (Figure 1A, panel c), whereas MC with non-epithelioid phenotype showed weak, if any, expression of BMP-7 (Figure 1A, panel d). The decrease of BMP-7 during *in vitro* and *in vivo* EMT was significant in both cases (Figure 1A, right graphs). The decrease of BMP-7 expression in omentum-derived MC treated with TGF- β 1 could also be demonstrated by Western blot analysis (Figure 1B). These data were further confirmed in a more quantitative manner by measuring the expression levels of BMP-7 by ELISA in cellular extracts from epithelioid and non-epithelioid MC obtained from different donors and in lysates from omentum MC treated or not with TGF- β 1 (Figure 1C). Exposure of omentum MC for 24 to 72 hours to standard PD fluid with a high content of GDPs, which has been shown to trigger EMT-like changes in MC [13], resulted in significant downregulation of BMP-7 expression at each time point (High-GDPs vs Control, $P = 0.0099$ at 24 h; $P = 0.0074$ at 48 h, $P = 0.0081$ at 72 h) and in significant induction of TGF- β 1 expression at 72 h (High-GDPs vs Control, $P = 0.0077$) (Figures 1D and E). In contrast, when MC were incubated with more biocompatible PD fluids containing low GDP concentration, with little impact on EMT of MC [13], cells did not show repression of BMP-7 or induction of TGF- β 1 (Figures 1D and E).

In agreement with the BMP-7 expression pattern, omentum-derived MC showed basal activation (phosphorylation) of the BMP-7-specific Smad 1, 5 and 8 (Figure

2A). Treatment of cells with 1 ng/mL of TGF- β 1 during 24 or 48 hours resulted in decreased phosphorylation of Smad 1, 5 and 8 (Figure 2A) and enhanced phosphorylation of TGF- β 1-specific Smad 2 and 3 (Figure 2A). Furthermore, untreated MC showed nuclear immunostaining of activated forms of Smad 1, 5 and 8 (Figures 2B, left), which decreased upon TGF- β 1 treatment (Figure 2B, middle). Interestingly, co-treatment of MC with TGF- β 1 and rhBMP-7 (0.5 μ g/mL) restored the activation and nuclear translocation of BMP-7-specific Smads (Figure 2B, right). These results indicated that TGF- β 1-mediated blockade of Smad1, 5 and 8 activations could be mediated by BMP-7 downregulation or by modulation of BMP-7 signalling, and that exogenous addition of rhBMP-7 prevented the effect of TGF- β 1.

BMP-7 counteracts TGF- β 1-induced EMT of MC

Since exogenous BMP-7 prevented the inactivation of Smad 1, 5 and 8 by TGF- β 1, we investigated the role of BMP-7 in maintaining the epithelial phenotype of MC. To this end, we analysed the effect of rhBMP-7 on EMT of MC *in vitro*. Treatment of omentum-derived MC with 1 ng/mL of TGF- β 1 during 48 hours resulted in morphological change to a fibroblast-like shape and in E-cadherin downregulation, which were prevented by co-treatment with 0.5 μ g/mL of rhBMP-7 (Figures 3A and B). In addition, rhBMP-7 completely blocked TGF- β 1-mediated upregulation of the mesenchymal markers collagen I, α -SMA and VEGF (Figures 3C to F). These results demonstrated that BMP-7 was involved in the epithelial maintaining of MC and prevented the mesenchymal conversion of these cells.

BMP-7 ameliorates PM structural alteration in a rat model of PD fluid exposure

Since EMT of MC is an important process in PM dysfunction and BMP-7 is able to block the EMT process, we analysed the effects of this protein in a model of PD fluid exposure in rats. With this purpose, rats were instilled daily via catheters with glucose-based PD fluid and treated or not with rhBMP-7 by intraperitoneal route (PDF and PDF + BMP-7 groups). Rats that were not surgically treated and received no fluid instillation served as control group (Control). Peritoneal inflammation and tissue repair are early responses to PD fluid exposure, which in turn may promote the induction of EMT of MC, the activation of fibroblasts, the accumulation of ECM and angiogenesis [7]. Thus, we first analysed if rhBMP-7 might have any effect in the recruitment of inflammatory cells into the peritoneal cavity, in the local production of hyaluronic acid and in the regenerative response. As shown in Table 1, rhBMP-7-treatment did not affect significantly any of these processes induced by PD fluid exposure, except for a tendency to reduce hyaluronic acid production ($P = 0.054$), which suggested a decrease of peritoneal fibrosis.

The histological analysis of parietal peritoneum biopsies showed that PD fluid exposure resulted in increased thickness compared with control rats (Figure 4) and in the accumulation of transdifferentiated MC in the submesothelial

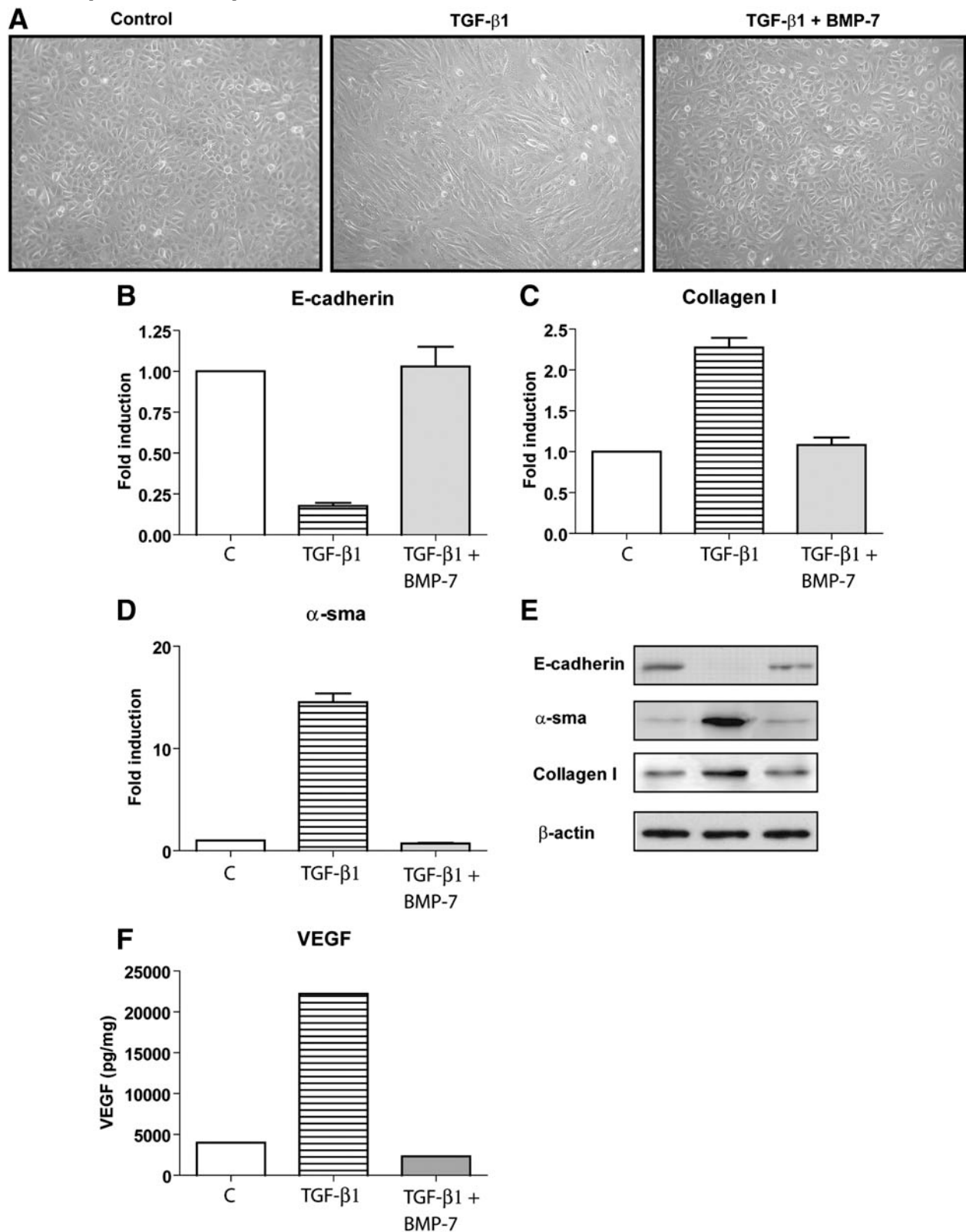


Fig. 3. BMP-7 blocks TGF- β 1-induced EMT of MC. Omentum-derived MC were treated for 48 hours with 1 ng/mL TGF- β 1, in the presence or absence of 0.5 μ g/mL of BMP-7. (A). Phase-contrast microscopy shows that BMP-7 treatment prevents non-epithelial phenotype acquisition of MC. Magnification $\times 200$. (B–D). Western blot analysis shows that BMP-7 treatment prevents TGF- β 1-induced E-cadherin downregulation (B) as well as collagen I (C) and α -SMA upregulation (D). The experiment was repeated three times, and results are depicted as means plus SD. (E). A representative experiment is shown. (F). Analysis of VEGF expression by ELISA demonstrates that BMP-7 prevents TGF- β 1-mediated induction of this growth factor. Bars represent values obtained by ELISA and are depicted as picograms per milligrams of total cellular proteins. A representative experiment is shown.

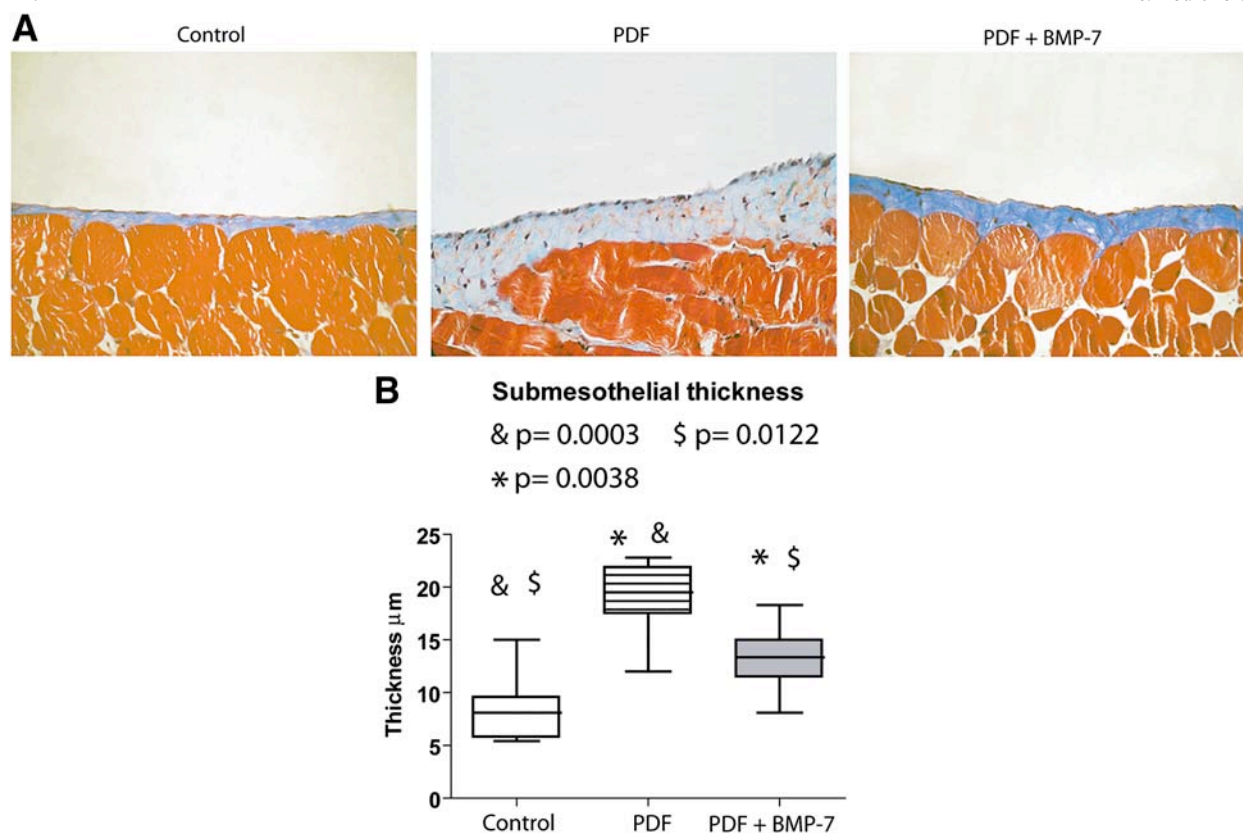


Fig. 4. Effect of BMP-7 on thickness of parietal peritoneum of PD fluid-exposed rats. (A). Masson's trichrome staining of parietal peritoneum shows a marked increase of extracellular matrix deposition in rats exposed to standard PD fluid (PDF), and BMP-7 treatment significantly reduces this effect (PDF + BMP-7). (B). The peritoneal thickness (micrometre) is increased in group PDF ($n = 8$) compared with control rats ($n = 8$), and the group PDF + BMP-7 ($n = 12$) shows a significant reduction of thickness when compared with group PDF. Box plots represent 25 and 75 percentiles, median, minimum and maximum values. Symbols show statistical differences between groups. Magnification $\times 200$.

space (cytokeratin-positive cells), some of which also showed expression of the activated fibroblast marker fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) [21] (Figure 5). The administration of rhBMP-7 significantly reduced the thickness and the presence of submesothelial cytokeratin-positive cells (Figures 4 and 5). Interestingly, a correlation between thickness and numbers of cytokeratin-positive cells in the compact zone was observed, reinforcing the notion of the relevance of EMT of MC in peritoneal fibrosis (Figure 5C). PD fluid exposure also resulted in recruitment of activated macrophages (ED2) and in new vessel formation (CD31) in the parietal peritoneum compared with control rats (Figure 6A). Treatment with rhBMP-7 resulted in a significant reduction of angiogenesis but did not affect the influx of activated macrophages (Figure 6A). As above, a correlation between vessel formation and numbers of cytokeratin-positive cells was observed (Figure 6B), suggesting that EMT of MC is a key process not only in peritoneal fibrosis but also in angiogenesis.

Discussion

The presence of MC that have undergone an EMT in the effluent and in the peritoneum of PD patients was first demonstrated in a landmark paper published in 2003 [8]. During the last few years, emerging evidence has sug-

gested that the mesenchymal conversion of MC is an important mechanism of peritoneal structural and functional deterioration [11,13,14]. From the clinical nephrologist's perspective, perhaps the most important aspect of the identification of the EMT of MC as a key event in PM failure is that this process can be modulated with a number of endogenous factors and pharmaceutical agents [7,21,41]. In this context, the endogenous factor BMP-7 has been demonstrated to block and reverse the mesenchymal conversion of different types of epithelial cells and of endothelial cells *in vitro* by activating Smad-5, which interferes with TGF- β -activated Smad-2/3 [21,24–26]. It has also been shown in various animal models that BMP-7 treatment prevents and reverses diverse acute or chronic fibrotic diseases [21–26,42]. However, only few works about the role of BMP-7 in mesenchymal conversion of MC or in PM alteration have been reported [30,31,43]. It has been demonstrated that BMP-7 is able to promote a reversion from mesenchymal to epithelial phenotype of effluent-derived MC [30] and to block high-glucose-induced EMT of omentum-derived MC *in vitro* [31]. The therapeutic strategies to preserve the PM during PD may be designed either to prevent or to reverse the EMT [7]. It has been shown that BMP-7 treatment further reverses peritoneal fibrosis during a peritoneal resting period in PD fluid-exposed rats [31]. However, the ability of BMP-7 to counteract TGF- β 1-mediated EMT of MC and to prevent

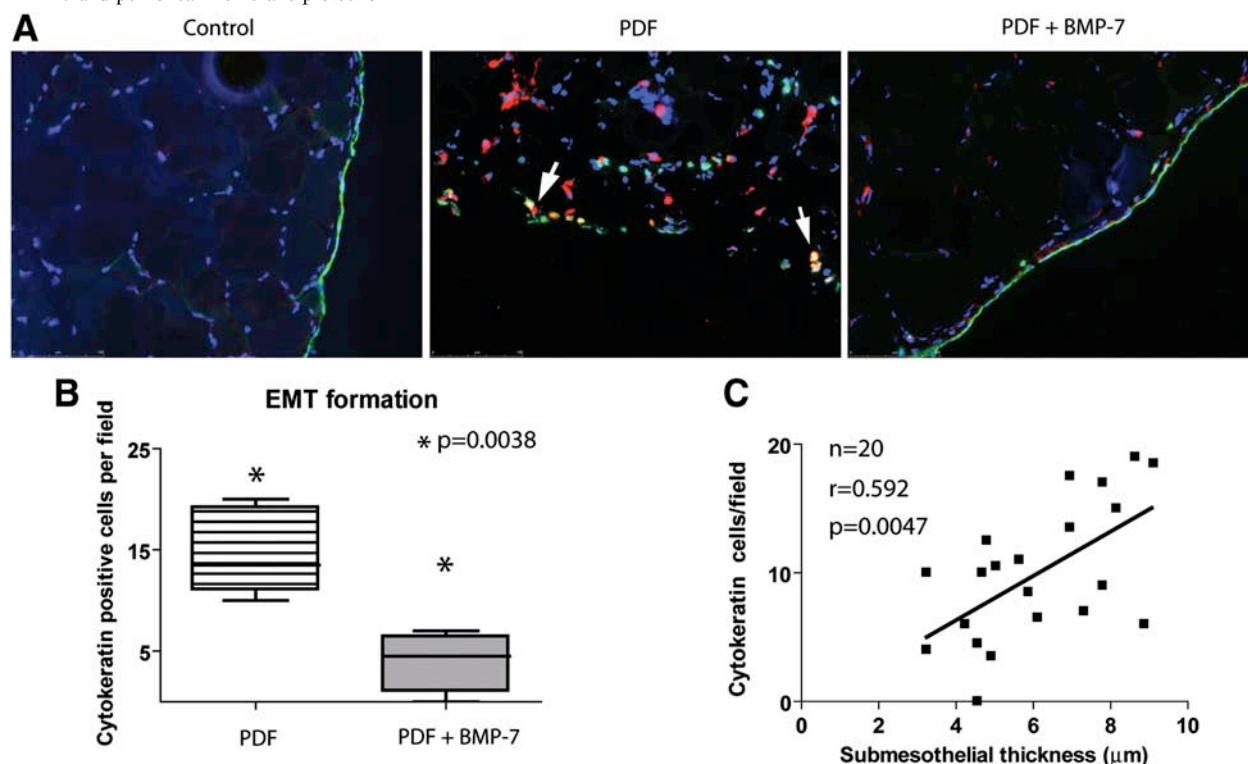


Fig. 5. Effect of BMP-7 on the number of transdifferentiated MC in the compact zone of parietal peritoneum. (A). Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal sections stained for cytokeratin (green) and FSP-1 (red) with DAPI counterstaining shows accumulation of transdifferentiated MC in the submesothelial space (cytokeratin-positive cells), some of which also show expression FSP-1 (arrows) in the PDF group. The administration of BMP-7 reduces the number of submesothelial cytokeratin positive cells per field (PDF + BMP-7). Magnification $\times 200$. (B). The reduction of the number of invading MC by BM-7 is significant. Box plots represent 25 and 75 percentiles, median, minimum and maximum values. Symbols show statistical differences between groups. (C). Correlation between PM thickness (micrometre) and number of cytokeratin-positive cells per field at the compact zone in the whole group of rats treated with PD fluid (Spearman regression, $P = 0.0047$; $n = 20$).

PM deterioration during PD fluid exposure has not been addressed.

In the present study, we show that MC constitutively express BMP-7 and display basal activation of Smads 1, 5 and 8. Induction of EMT with different stimuli results in downregulation of BMP-7 and inactivation of BMP-7-specific Smad proteins. Mechanistically, the TGF- β 1-mediated inhibition of BMP-7 signalling might be explained by BMP-7 downregulation itself, or alternatively, by the upregulation of modulators of BMP-7 and TGF- β 1 pathways. In this context, it has been shown that connective tissue growth factor (CTGF), a cytokine that is induced in MC upon TGF- β 1 treatment [43–45], inhibits BMP-7 and activates TGF- β 1 signals by direct binding in the extracellular space [46,47]. In addition, mesothelial BMP-7 signalling might also be influenced by other members of the TGF- β superfamily and by other BMP-7 modulators such as gremlin, noggin, kielin/chordin-like protein or uterine sensitization-associated gene 1 [48]. Thus, the relative contribution of these different factors in the inhibition of BMP-7 pathway by TGF- β 1 remains to be established and deserves further studies.

We could demonstrate that exposure of MC to PD fluid with a high content of GDPs results in downregulated expression of BMP-7 and in the upregulation of TGF- β 1. Interestingly, when MC are exposed to fluids with iden-

tical concentration of glucose but with low-GDP content, which have been proved to have little impact on EMT of MC [13], there is no repression of BMP-7 and no induction of TGF- β 1 synthesis. In contrast, a recent study has shown that culture media with high glucose induced EMT and BMP-7 downregulation. The authors concluded that these effects were due to D-glucose per se and not to high osmolality or to GDPs, because L-glucose did not induce EMT [31]. An explanation of these apparent discrepancies could be that different types of GDPs, with different impacts on EMT, were generated from D-glucose and L-glucose during sterilization process or during their storage. We believe that both high glucose and GDPs may have a role for EMT *in vitro*, depending on experimental conditions, and certainly have additive effects on PD-fluid-induced peritoneal damage.

The data presented in this work demonstrate that addition of exogenous rhBMP-7 prevents the inactivation of Smad 1, 5 and 8 and by TGF- β 1 and completely blocks TGF- β 1-induced EMT of MC *in vitro*. These results suggest that BMP-7 has a role in preserving the epithelial phenotype of MC. Administration of rhBMP-7 to rats exposed to PD fluid results in preservation of MC monolayer and in reduction of invading MC, demonstrating that rhBMP-7 is also effective *in vivo* in the prevention of EMT. Furthermore, treatment with

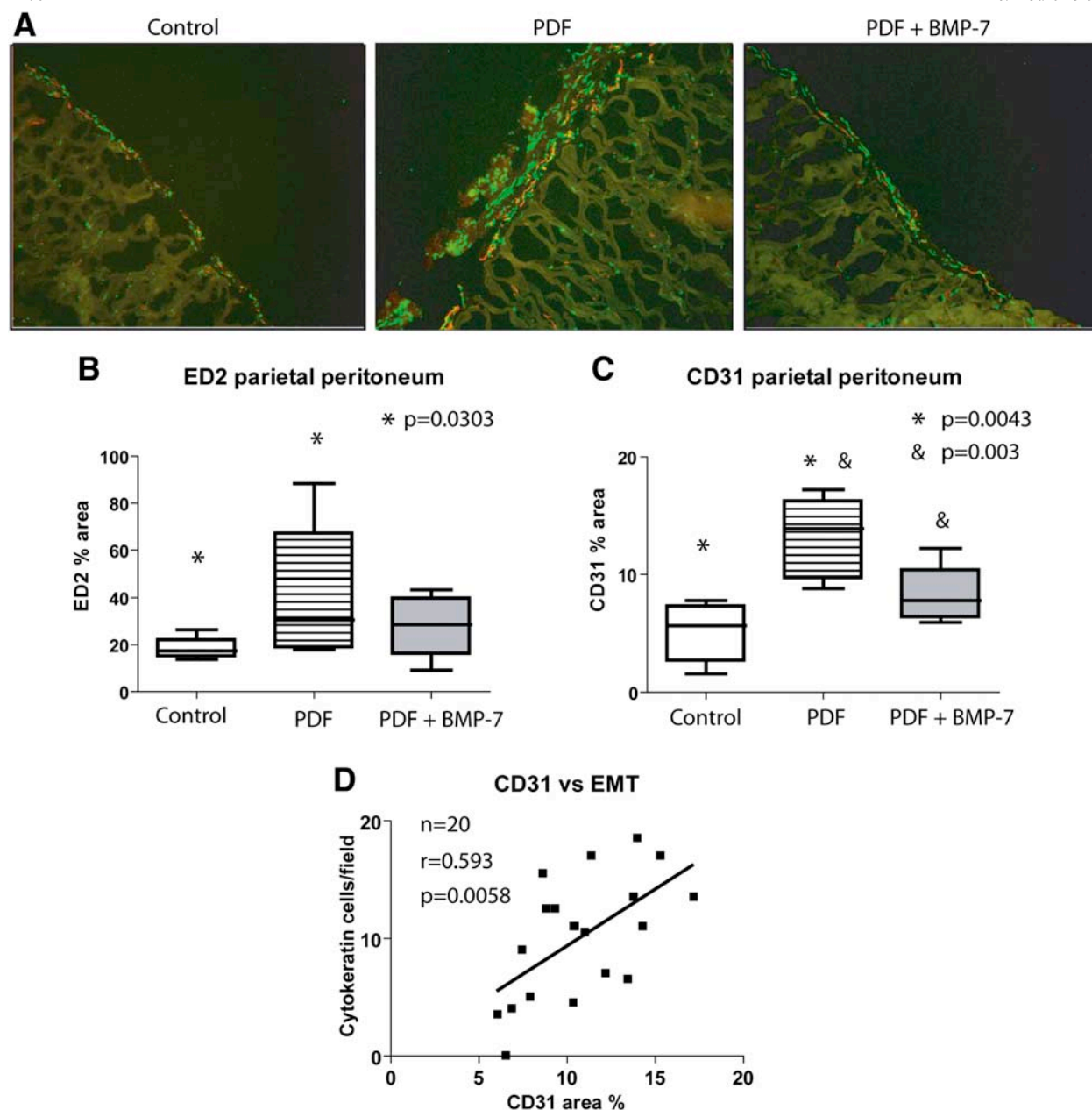


Fig. 6. Effect of BMP-7 on Macrophage recruitment and angiogenesis at the parietal peritoneum. (A). Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal sections stained for ED2 (green) and CD31 (red) shows accumulation of activated macrophages and an increase in vasculature in rats exposed to PD fluid (PDF). Magnification $\times 400$. (B, C). The administration of BMP-7 (PDF + BMP-7) does not affect the recruitment of macrophages (B) but reduces significantly the number of vessels (C). The positive area for ED2 and CD31 is calculated as a percentage of the total area of the tissue. Box plots represent 25 and 75 percentiles, median, minimum and maximum values. Symbols show statistical differences between groups. (D). Correlation between CD31 staining (% area) and number of cytokeratin-positive cells per field at the peritoneal compact zone of rats treated with PD fluid (Spearman regression, $P = 0.0058$; $n = 20$).

rhBMP-7 reduces extracellular matrix deposition and new vessel formation in the parietal peritoneum, indicating an association between EMT of MC and both fibrosis and angiogenesis. Interestingly, rhBMP-7 treatment has no effect on inflammatory and regenerative responses. It can be hypothesized that these two processes are EMT independent and probably upstream to EMT.

In a recent study using a cohort of 50 new PD patients, it has been shown that the levels of BMP-7 in the effluents,

measured at 4 weeks after PD starting, correlated with peritoneal transport characteristics, and that a high BMP-7 level was associated with a gradual increase in peritoneal transport parameters with time [49]. At first glance, these observations may seem contradictory with the expected beneficial effect of BMP-7. However, the elevated levels of BMP-7 during the early stages of PD might simply represent an intense reparative response of injured peritoneal tissue, which resulted in increased mass of MC and en-

Table 1. Composition of peritoneal leukocytes, liver imprints and hyaluronic acid

	Control	PDF	PDF + BMP-7
Total peritoneal cells ($\times 10^6$)	23.5 \pm 3.6	214.5 \pm 51.7*	205.4 \pm 182.4*
Macrophages %	72.8 \pm 6.1	65.6 \pm 35.7	74.75 \pm 21
Lymphocytes %	0.5 \pm 0.7	0.8 \pm 0.5	0.25 \pm 0.25
Neutrophils %	2.4 \pm 1.7	27.3 \pm 31.4**	21.25 \pm 20.5*
Eosinophils %	11.5 \pm 3.3	4.6 \pm 8.1*	1.5 \pm 2*
Mast cells %	12.25 \pm 5.5	0.1 \pm 0.3*	0.25 \pm 0.25*
Liver imprints (cells/mm ²)	1168 \pm 273	2045 \pm 548*	2193 \pm 544*
Hyaluronic acid	21.4 \pm 24.6	2424.9 \pm 2896.8*	1090 \pm 1131.6*, ***

* $P < 0.01$ versus Control.** $P < 0.05$ versus Control.*** $P = 0.054$ versus PDF.

hanced production of BMP-7, as we and others [31] have demonstrated that MC are a site of BMP-7 synthesis.

The main limitation of this study is the use of a rhBMP-7 in a rodent model of PD fluid exposure, which might trigger an immune/inflammatory response against this protein. In fact, we observed that rhBMP-7 treatment induced per se a significant increase of HA production and a slight but significant increase of fibrosis at the parietal peritoneum (Supplementary Table S1 and Figure S1). In addition, although BMP-7 treatment alone did not result in an increase of total leukocyte recruitment into the peritoneal cavity, it promoted a switch in the percentages of some leukocyte subpopulations; increased neutrophils and decreased eosinophil and mast cell proportions, in a similar manner to that observed in PDF-treated animals (Supplementary Table S1). It can be speculated that this immune response could mask and/or neutralize part of the protective effects of rhBMP-7.

In summary, our results indicate that TGF- β 1 and BMP-7 pathways maintain a balance in the control of EMT of MC and that addition of exogenous rhBMP-7 completely blocks the mesenchymal conversion of MC. To our knowledge, this work is the first to show the preventive effect of BMP-7 on PM damage in an animal model of PD fluid exposure. We believe that our results about the beneficial effects of rhBMP-7 provide evidence about the feasibility of considering the EMT of MC as a therapeutic target to ameliorate PM deterioration in PD patients. Further studies of the BMP-7 signalling pathway will provide more specific strategies of interventions (e.g. by using agonists of the BMP-7 receptors) with minimum side effects.

Acknowledgements. We would like to thank the nurses from the Peritoneal Dialysis Units for their help in recompilation of peritoneal effluents and omental samples. We also thank Francisca Molina Jiménez for technical assistance. This work was supported by grants SAF2007-61201 and PET2006-0256 (from Ministerio de Educación y Ciencia) to Dr. M. López-Cabrera, FIS PI06/0098 and RETICS 06/0016 (from Fondo Investigaciones Sanitarias) to R Selgas and C05.2142 (from Dutck Kidney Foundation) to J. van den Born and R.H.J. Beelen. This work was also partially supported by Fresenius Medical Care and Gambro Europe.

Conflict of interest statement. None declared.

Appendix A

Supplementary Figure S1 effect of BMP-7 on thickness of parietal peritoneum of PD fluid-exposed rats. The peritoneal thickness (micrometre) is increased in group PDF ($n = 8$) compared with control rats ($n = 8$), and the group PDF + BMP-7 ($n = 12$) shows a significant reduction of thickness when compared with group PDF. Rats treated with BMP-7 alone (BMP-7, $n = 4$) also show a significant increase of peritoneal thickness compared with control group. Box plots represent 25 and 75 percentiles, median, minimum and maximum values. Symbols show statistical differences between groups. Magnification $\times 200$.

References

- Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55: 341–356
- Krediet RT, Lindholm B, Rippe B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* 2000; 20: S22–S42
- Williams JD, Craig KJ, Topley N *et al.* Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 470–479
- Mateijsen MA, van der Wal AC, Hendriks PM *et al.* Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* 1999; 19: 517–525
- Plum J, Hermann S, Fusshöller A *et al.* Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S42–S47
- Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E *et al.* Functional longevity of the human peritoneum: how long is continuous peritoneal dialysis possible? Results of a prospective medium long-term study. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 64–73
- Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA *et al.* Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2004–2013
- Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403–413
- Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS *et al.* Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444: 247–256
- Aguilera A, Yanez-Mo M, Selgas R *et al.* Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Invest Drugs* 2005; 6: 262–268

11. Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R *et al.* Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 938–948
12. Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 2003; 63: 1530–1539
13. Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Loureiro J *et al.* Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 582–592
14. Del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, Bajo MA *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells is an early event during peritoneal dialysis and is associated with high peritoneal transport. *Kidney Int Suppl* 2008; 108: S26–S33
15. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286–1292
16. Lai KN, Lai KB, Lam CW *et al.* Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 644–652
17. Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 2003; 23: 530–541
18. Strippoli R, Benedicto I, Pérez-Lozano ML *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF-kappaB/Snail1 pathway. *Dis Model Mech* 2008; 1: 264–274
19. Margetts PJ, Kolb M, Galt T *et al.* Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2029–2039
20. Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L *et al.* Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 425–436
21. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776–1784
22. Hruska KA, Guo G, Wozniak M *et al.* Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F130–F143
23. Wang S, Chen Q, Simon TC *et al.* Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; 63: 2037–2049
24. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H *et al.* BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9: 964–968
25. Zeisberg M, Yang C, Martino M *et al.* Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337–23347
26. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 952–961
27. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002; 296: 1646–1647
28. Wrana JL. Regulation of Smad activity. *Cell* 2000; 100: 189–192
29. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 169–178
30. Vargha R, Endemann M, Kratochwill K *et al.* Ex vivo reversal of in vivo transdifferentiation in mesothelial cells grown from peritoneal dialysate effluents. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2943–2947
31. Yu MA, Shin KS, Kim JH *et al.* HGF and BMP-7 ameliorate high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelium. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 567–581
32. López-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS *et al.* Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* 2006; 26: 26–34
33. Merrihew C, Soeder S, Rueger DC *et al.* Modulation of Endogenous osteogenic protein-1 (OP-1) by interleukin-1 in adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 67–74
34. Hekking LHP, Aalders MC, Van Gelderop E *et al.* Effect of peritoneal dialysis fluid measured in vivo in a rat-model of continuous peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 1998; 14: 14–18
35. Zareie M, De Vriese AS, Hekking LH *et al.* Immunopathological changes in a uraemic rat model for peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1350–1361
36. Zareie M, Tangelder GJ, ter Wee PM *et al.* Beneficial effects of aminoguanidine on peritoneal microcirculation and tissue remodeling in a rat model of PD. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 2783–2792
37. Zareie M, van Lambalgen AA, ter Wee PM *et al.* Better preservation of the peritoneum in rats exposed to amino acid-based peritoneal dialysis fluid. *Perit Dial Int* 2005; 25: 58–67
38. Zareie M, Fabbri P, Hekking LH *et al.* Novel role for mast cells in omental tissue remodeling and cell recruitment in experimental peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3447–3457
39. Fosang AJ, Hey NJ, Carney SL *et al.* An ELISA plate-based assay for hyaluronan using biotinylated proteoglycan G1 domain (HA-binding region). *Matrix* 1990; 10: 306–313
40. Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN. The mesothelium: techniques for investigating the origin, nature and behaviour of mesothelial cells. *J Pathol* 1980; 132: 263–271
41. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1–12
42. Vukicevic S, Basic D, Rogic D *et al.* Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 1998; 102: 202–214
43. Leung JC, Chan LY, Tam KY *et al.* Regulation of CCN2/CTGF and related cytokines in cultured peritoneal cells under conditions simulating peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 458–469
44. Zarrinkalam KH, Stanley JM, Gray J *et al.* Connective tissue growth factor and its regulation in the peritoneal cavity of peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 2003; 64: 331–338
45. Szeto CC, Lai KB, Chow KM *et al.* Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of connective tissue growth factor and vascular endothelial growth factor by peritoneal mesothelial cells. *Nephron Exp Nephrol* 2005; 99: e95–e104
46. Abreu JG, Keptura NI, Reversade B *et al.* Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 599–604
47. Nguyen TQ, Roestenberg P, van Nieuwenhoven FA *et al.* CTGF inhibits BMP-7 signaling in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2098–2107
48. Zeisberg M. Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 568–573
49. Szeto CC, Chow KM, Kwan BCH *et al.* The relationship between bone morphogenic protein-7 and peritoneal transport characteristics. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2989–2994

Received for publication: 5.6.09; Accepted in revised form: 23.10.09

Cyclooxygenase-2 Mediates Dialysate-Induced Alterations of the Peritoneal Membrane

Luiz S. Aroeira,^{*†} Enrique Lara-Pezzi,^{*‡} Jesús Loureiro,^{*‡} Abelardo Aguilera,^{*§} Marta Ramírez-Huesca,^{*‡} Guadalupe González-Mateo,^{*†} M. Luisa Pérez-Lozano,^{*‡} Patricia Albar-Vizcaíno,^{*‡} M-Auxiliadora Bajo,^{*†} Gloria del Peso,^{*†} José Antonio Sánchez-Tomero,^{*§} José Antonio Jiménez-Heffernan,^{*||} Rafael Selgas,^{*†} and Manuel López-Cabrera^{*‡||}

^{*}Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas, [†]Unidad de Investigación and Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, [‡]Unidad de Biología Molecular and [§]Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de la Princesa, ^{||}Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Puerta de Hierro, and ^{||}Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

ABSTRACT

During peritoneal dialysis (PD), exposure of the peritoneal membrane to nonphysiologic solutions causes inflammation, ultimately leading to altered structure and function. Myofibroblasts, one of the cell types that contribute to dysfunction of the peritoneal membrane, can originate from mesothelial cells (MCs) by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process that has been associated with an increased rate of peritoneal transport. Because cyclooxygenase-2 (COX-2) is induced by inflammation, we studied the role of COX-2 in the deterioration of the peritoneal membrane. We observed that nonepithelioid MCs found in peritoneal effluent expressed higher levels of COX-2 than epithelioid MCs. The mass transfer coefficient for creatinine correlated with MC phenotype and with COX-2 levels. Although COX-2 was upregulated during EMT of MCs *in vitro*, COX-2 inhibition did not prevent EMT. In a mouse model of PD, however, COX-2 inhibition with Celecoxib resulted in reduced fibrosis and in partial recovery of ultrafiltration, outcomes that were associated with a reduction of inflammatory cells. Furthermore, PD fluid with a low content of glucose degradation products did not induce EMT or COX-2; the peritoneal membranes of mice treated with this fluid showed less worsening than mice exposed to standard fluid. In conclusion, upregulation of COX-2 during EMT may mediate peritoneal inflammation, suggesting COX-2 inhibition as a potential strategy to ameliorate peritoneal deterioration in PD patients.

J Am Soc Nephrol 20: 582–592, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008020211

Peritoneal dialysis (PD) is a therapeutic option for the treatment of ESRD and is based on the use of the peritoneum as a semipermeable membrane across which ultrafiltration and diffusion take place.^{1,2} Continuous exposure to nonphysiologic PD solutions and episodes of peritonitis or hemoperitoneum cause inflammation and injury to the peritoneal membrane (PM), which undergoes fibrosis, angiogenesis, and hyalinizing vasculopathy.³ These morphologic alterations seem to be associated with increased small-solute transport rate and with ul-

trafiltration dysfunction of the PM.^{2,3} Resident myofibroblasts and infiltrating inflammatory cells

Received February 22, 2008. Accepted October 27, 2008.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Manuel López-Cabrera, Unidad de Biología Molecular, Hospital Universitario de la Princesa, C/ Diego de León No. 62, 28006-Madrid, Spain. Phone: 34-91-5202334; Fax: 34-91-5202374; E-mail: mlopez.hlpr@salud.madrid.org

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology

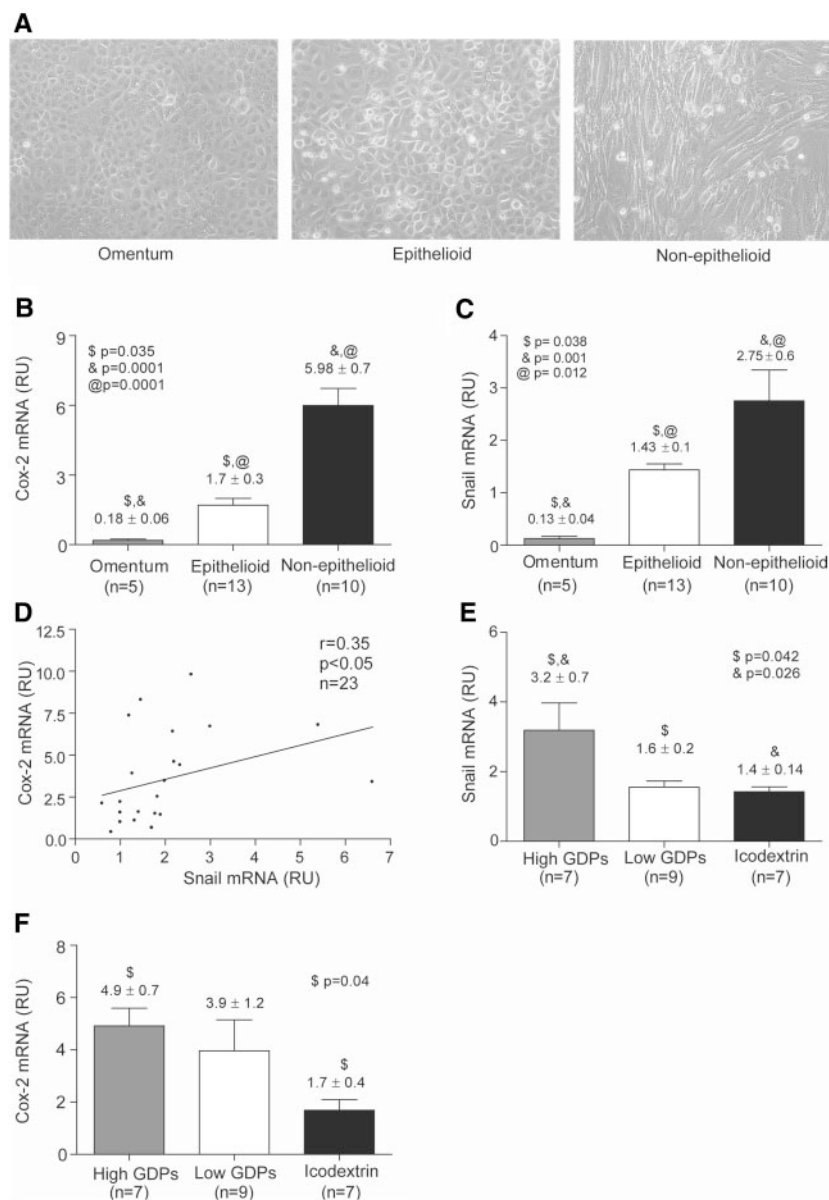


Figure 1. COX-2 and Snail expression in omentum- and PD effluent-derived MCs. (A) Phase-contrast microscopy shows different morphologic characteristics of MCs. (Left) Typical phenotype of human peritoneal MCs. (Middle and Right) MCs with epithelioid and nonepithelioid phenotypes. (B) Differences in COX-2 mRNA expression in MCs with different phenotypes. (C) Differences in Snail mRNA expression in MCs with different phenotypes. (D) Statistically significant linear correlation between COX-2 and Snail mRNA expression in effluent-derived MC. (E) Differences in Snail mRNA expression in MCs from patients treated with standard PD fluids with high content of GDP (High GDPs) or bio-compatible PD fluids with low content of GDPs (Low GDPs) or receiving one exchange per day with icodextrin-containing solution (Icodextrin). (F) Differences in COX-2 mRNA expression in MCs from patients treated with different PD fluids. Bars represent means \pm SE. Symbols show statistical differences between groups.

have been considered the main entities responsible of the structural and functional alterations of the peritoneum. More recently, however, it has been shown that mesothelial cells (MCs) may also play an active role in PM alteration.⁴ It has been demonstrated that during PD-induced inflammatory and repair responses, MCs show a progressive loss of epithelial phenotype and acquire myofibroblast-like characteristics by an epithelial-mesenchymal transition (EMT).^{2,5,6} The myofibroblastic conversion of MCs has been confirmed in an animal model based on intraperitoneal overexpression of TGF- β 1.⁷ The EMT of MCs is a complex process that is characterized by the increased expression of the transcriptional repressor Snail, which negatively regulates the expression of E-cadherin and other adhesion molecules, resulting in disruption of intercellular junctions. Then, MCs adopt a front-back polarity and acquire increased capacity to invade the submesothelial com-

pact zone, where they contribute to inflammatory responses, fibrosis, and angiogenesis that ultimately lead to PM failure.^{2,4,8}

Cyclooxygenases (COX) are the rate-limiting enzymes that are involved in the synthesis of prostaglandins by oxidation of arachidonic acid.⁹ Whereas COX-1 is constitutively expressed and is involved in homeostatic functions, COX-2 expression is inducible and is involved in a number of pathologic processes, including inflammation, angiogenesis, and tumor growth.^{9–11} In regard to the role of COX-2 in fibrosis, both profibrotic and antifibrotic functions have been described for this enzyme.^{12–15} Whether COX-2 is involved in PM deterioration during PD has not been explored in depth. It has been shown that prostaglandins are locally produced in the peritoneal cavity of PD patients and that their synthesis increases during peritonitis, which results in enhanced peritoneal permeability to macro-

Table 1. Baseline characteristics of PD patients with different phenotypes of MC^a

Parameter	Studied Population (n = 23)	Effluent MC Phenotypes		P
		Epithelioid (n = 13)	Nonepithelioid (n = 10)	
Age (yr)	67.88 ± 14.60	65.20 ± 11.10	68.20 ± 16.00	NS
Time on PD (mo)	9.47 ± 7.44	8.80 ± 5.00	11.30 ± 8.40	NS
EPO (U/kg per wk)	88.80 ± 54.10	80.10 ± 46.20	93.50 ± 52.10	NS
Inflammation (d) ^b	1.80 ± 0.840 (1.00 to 3.00)	0.00 ± 0.00	1.80 ± 0.84	0.0001
Glucose load (kg)	44.10 ± 28.10	42.20 ± 22.60	48.50 ± 31.10	NS
Urea-MTC (ml/min)	22.10 ± 3.30	20.80 ± 3.23	23.92 ± 2.60	NS
Cr-MTC (ml/min)	10.80 ± 7.30	9.70 ± 1.00	12.43 ± 2.60	0.0600 (NS)
UF 3.86% (ml) ^c	641.70 ± 89.30	650.00 ± 57.70	631.00 ± 121.00	0.0800 (NS)
CCr (ml/min)	1.30 ± 3.40	1.50 ± 2.90	0.90 ± 3.70	NS
COX-2 mRNA (RU)	3.56 ± 2.75	1.70 ± 1.00	5.98 ± 2.33	0.0001
Snail mRNA (RU)	2.00 ± 1.40	1.43 ± 0.40	2.75 ± 1.87	0.0120

^aData are means ± SD. CCr, clearance of creatinine; EPO, recombinant human erythropoietin; UF, ultrafiltration.

^bThe phenotypes of MC showed an association with episodes of peritonitis or hemoperitoneum. None of the patients with epithelioid MC in their effluents experienced these pathologic conditions, whereas 50% (five of 10) of patients with nonepithelioid MC had episodes of peritonitis (n = 3) or hemoperitoneum (n = 2; P < 0.05, two-tail Fisher exact test).

^cPeritoneal exchange with glucose 3.86% during 4 h.

molecules.^{16,17} The most possible sources of prostaglandins released into the PD dialysate are macrophages and MCs. Experiments *in vitro* have demonstrated that exposure of monocytes to advanced glycation end products results in increased COX-2 expression and prostaglandin E₂ (PGE₂) secretion¹⁸ and that high glucose concentration increases PGE₂ synthesis in MCs.¹⁹

Herein, we demonstrate that COX-2 is upregulated during the EMT of MC and that peritoneal transport rate correlates with COX-2 expression *ex vivo*. We also show that COX-2 inhibition does not prevent EMT *in vitro* but ameliorates PM worsening *in vivo* in a mouse model of PD fluid exposure. The data point to COX-2 as key player in the setting and maintenance of peritoneal inflammation and reveal anti-inflammatory therapy as a strategy to preserve PM integrity in PD patients.

RESULTS

Upregulation of COX-2 Expression during the EMT of MCs in PD Patients

We analyzed the possible association of COX-2 upregulation with the EMT of MCs, a key process in PM dysfunction.² Effluent-derived MC from 23 clinically stable PD patients were grouped in epithelioid and nonepithelioid phenotypes according to their morphology at confluence (Figure 1A) and expression patterns of epithelial or mesenchymal markers.² Omentum-derived MC from five nonuremic donors were used as a control. The baseline characteristics of the patients and the differences between the subgroups according to the phenotype of effluent MCs are shown in Table 1. Quantitative reverse transcription–PCR analysis showed a progressive and significant upregulation of COX-2 mRNA expression *ex vivo* as EMT proceeded, with maximum increase in nonepithelioid MCs (Figure 1B). The expression of the EMT marker Snail also

showed a progressive increase along the transdifferentiation process (Figure 1C). The expression of COX-2 and Snail mRNAs presented a significant correlation, indicating that COX-2 expression was augmented in cells that underwent an EMT (Figure 1D).

Interestingly, the phenotype of effluent MCs was associated with the PD fluids used in patients. The distribution of patients according to PD fluids is shown in Supplemental Table S1. All of the patients (seven of seven) treated with standard PD fluids, with high content of glucose degradation products (GDPs), contained nonepithelioid MCs in their effluents. In contrast, patients treated with PD fluids containing low GDP concentration and patients treated with standard fluids and receiving one exchange per day with icodextrin-containing solution showed nonepithelioid MCs in 33% (three of nine) and 0% (zero of seven) of the cases, respectively (two-tail Fisher test, high GDPs *versus* low GDPs, P = 0.01; high GDPs *versus* icodextrin, P = 0.001). Furthermore, the expression of Snail showed correlation with the type of PD fluid, its expression being significantly higher in patients treated with standard PD fluids when compared with patients treated with low GDP solutions and patients receiving one icodextrin exchange (Figure 1E). The expression of COX-2 was also significantly higher in the standard PD fluids group when compared with the icodextrin group, but it did not reach statistical significance when compared with the low GDP group (Figure 1F).

Upregulation of COX-2 Expression during the EMT of MC In Vitro

The induction of COX-2 during EMT was confirmed *in vitro* using various stimuli. As shown in Figure 2A, omentum MC stimulated with TGF-β1 plus IL-1β showed a rapid and transient induction of COX-2 mRNA, which paralleled the expression pattern of Snail mRNA. As mentioned, the expression of COX-2 and Snail mRNAs showed a significant correlation

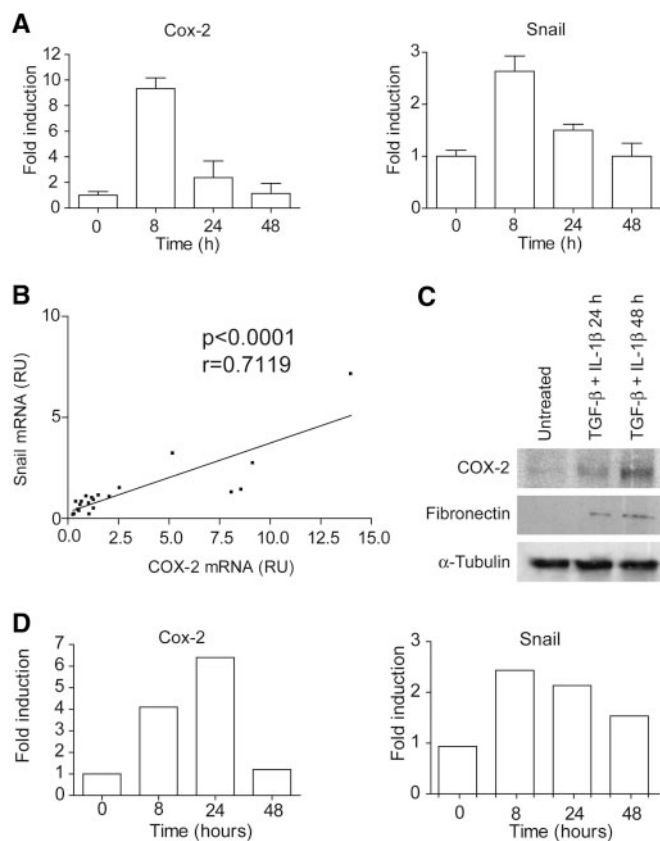


Figure 2. EMT of MC induced *in vitro* results in increased COX-2 and Snail expression. (A through D) EMT of MCs was induced *in vitro* by TGF- β plus IL-1 β stimulation (A through C) or by wound healing (D). (A) Induction of COX-2 and Snail mRNA expression at 8, 24, and 48 h in omentum-derived MCs. (B) Statistically significant linear correlation between Snail and COX-2 mRNA expression. (C) Western blot analysis of COX-2 and fibronectin expression at 24 and 48 h. (D) Induction of COX-2 and Snail mRNA expression at 8, 24, and 48 h after mechanical injury of MC monolayer. Bars in A represent the fold induction over untreated cells and are depicted as means \pm SE of three independent experiments conducted in duplicate. Bars in D show the fold induction over untreated cells of a representative experiment of three conducted.

(Figure 2B). The treatment with the cytokines also resulted in increased COX-2 protein expression in parallel with the mesenchymal marker fibronectin (Figure 2C). The upregulation of COX-2 during MC transdifferentiation was further verified in wound-healing experiments in which EMT was triggered by mechanical injury of confluent omentum-derived cell monolayers (Figure 2D).

Exposure of MCs to standard PD fluid, with high content of GDPs and buffered with lactate, resulted in a progressive downregulation of E-cadherin expression, indicative of EMT, and in a rapid and strong induction of PGE₂ secretion and COX-2 expression (Figure 3). When MCs were incubated with a more biocompatible PD fluid containing low GDP concentration and buffered with bicarbonate, the cells did not show

repression of E-cadherin; in fact, there was induction of this adhesion molecules at 24 h (Figure 3A), and the synthesis of PGE₂ and COX-2 was only slightly induced (Figure 3, B and C). Similar results were obtained with another low-GDP dialysis fluid buffered with lactate (Supplemental Figure S1).

Correlation between COX-2 Expression Ex Vivo and Peritoneal Transport Rate

Our data suggested that local upregulation of COX-2 in MCs could play an important role in the PM failure; therefore, we analyzed the correlation between COX-2 expression *ex vivo* by MCs and the transport characteristics of the PD patients. We observed a significant correlation ($r = 0.6$, $P < 0.001$) between COX-2 mRNA expression and mass transfer coefficient of creatinine (Cr-MTC; Figure 4A). When PD patients were subdivided into two groups according to their peritoneal transport characteristics—Cr-MTC ≤ 11 ml/min (low and low-average transporters) and Cr-MTC > 11 (high and high-average transporters)—we observed significant higher expression of COX-2 mRNA *ex vivo* ($P < 0.001$) in this last group (Figure 4B). In agreement with our previous study,⁴ Cr-MTC was also associated with effluent MC phenotype. None of the patients with epithelioid MCs in their effluents showed Cr-MTC > 11 , whereas 80% (eight of 10) of patients with nonepithelioid MCs showed Cr-MTC > 11 (two-tail Fisher test, $P < 0.01$). These results suggested that COX-2 upregulation during the EMT of MCs could play a role in the establishment of inflammatory response leading to PM deterioration in PD patients.

Inhibition of COX-2 Does not Affect EMT of MCs In Vitro

Because COX-2 expression was upregulated during the transdifferentiation of MCs, we investigated the role of COX-2 in the process of EMT. We analyzed the effect of the selective COX-2 inhibitor NS398 on EMT of MCs *in vitro*. The inhibitor did not prevent the TGF- β plus IL-1-induced morphologic changes or E-cadherin downregulation (Figure 5, A and B). As expected, NS398 inhibited the synthesis of the COX-2 metabolite PGE₂ (Figure 5C). In contrast, COX-2 inhibitor did not affect the upregulation of EMT-associated molecules, including the matrix components fibronectin (Figure 5D) and collagen I (data not shown) and the proangiogenic factor vascular endothelial growth factor (VEGF; Figure 5E). These results demonstrated that COX-2, despite being induced during EMT, was not involved in the mesenchymal conversion of MCs.

Inhibition of COX-2 Ameliorates PD-Induced PM Inflammation and Structural Alteration

Peritoneal inflammation is an early response to PD fluid exposure, which in turn may promote the induction of EMT of MCs, the accumulation of extracellular matrix (ECM), and angiogenesis. Thus, we analyzed whether the anti-inflammatory action of the COX-2 inhibitor Celecoxib might prevent PM worsening in a mouse model of PD fluid exposure. Mice

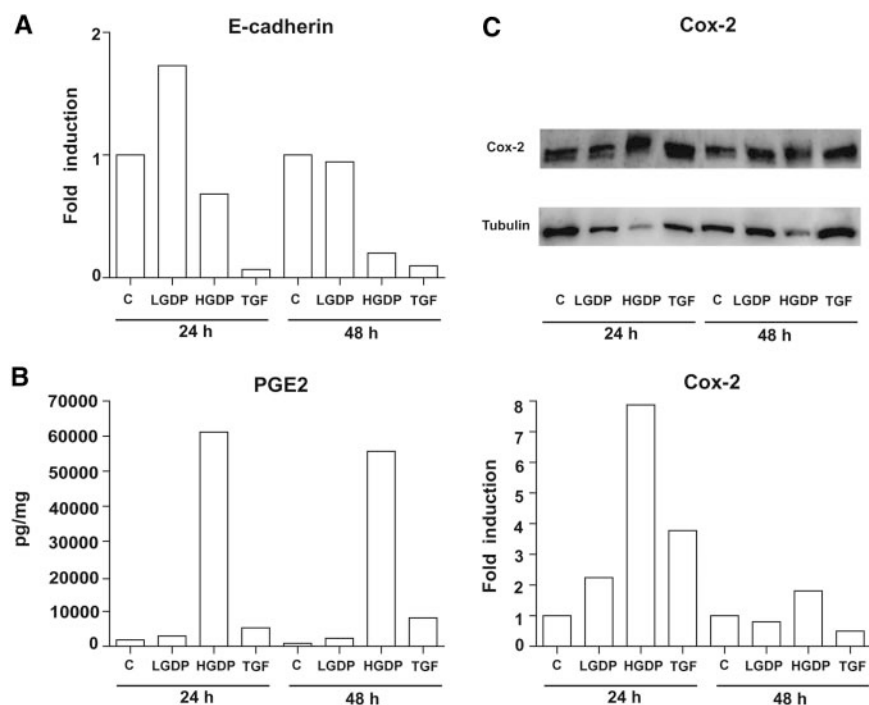


Figure 3. Effects of standard and low-GDP solutions on EMT of MCs and on COX-2 expression *in vitro*. Omentum-derived MCs were incubated for 24 or 48 h with control medium (C), standard PD fluid containing high GDPs (HGDP), or solution containing low GDPs (LGDP) diluted one half with culture medium. Cells were also treated with TGF- β plus IL-1 β (TGF). (A) Expression of E-cadherin was determined by Western blot. (B) The synthesis of PGE₂ was measured in culture medium supernatant by ELISA, and results are depicted as picograms per milligram of total cellular proteins. (C) The expression of COX-2 was analyzed by Western blot. Bars in A and C represent the fold induction of E-cadherin and COX-2 expression over the control after normalization with tubulin expression. The experiment was repeated at least three times, and a representative experiment is shown.

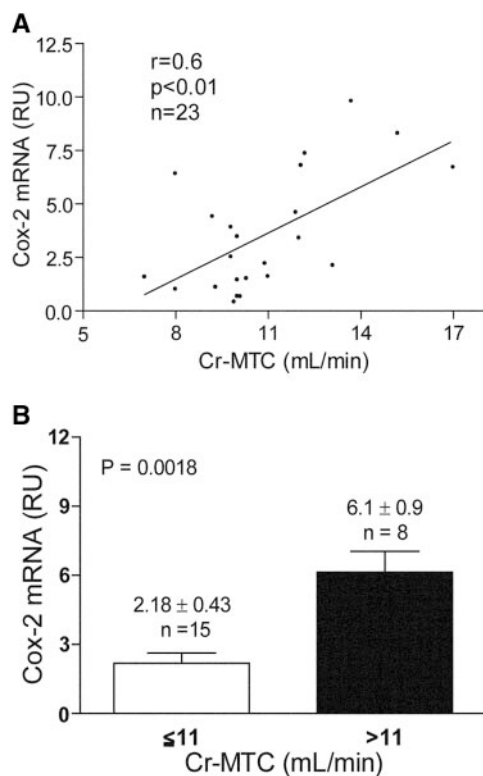


Figure 4. COX-2 expression in PD effluent MCs and peritoneal transport rate. (A) Linear correlation between COX-2 mRNA expression and Cr-MTC in the PD patient group. (B) Differences in COX-2 mRNA expression in MCs obtained from patients with low and low-average versus high and high-average (Cr-MTC ≤ 11 versus > 11 mL/min) peritoneal transport rates. Bars represent means \pm SE.

were daily instilled *via* catheters with saline or standard lactate-based PD fluid and treated with Celecoxib or vehicle by oral route for 5 wk. The histologic analysis of parietal peritoneum biopsies showed that PD fluid exposure resulted in increased inflammation, ECM accumulation, and thickness compared with saline-treated groups. The administration of the COX-2 inhibitor significantly reduced all of these morphologic changes. No significant differences were observed between mice that were instilled with saline and treated or not with Celecoxib (Figure 6, A and B). To test the effect of Celecoxib on PD fluid-induced angiogenesis, we stained blood vessels of parietal peritoneum with an anti-CD31 antibody. PD fluid-instilled mice showed a significant increase of vessel number compared with saline-instilled groups. The administration of the COX-2 inhibitor to PD fluid-instilled mice resulted only in a slight tendency to reduce angiogenesis, but it did not reach statistical significance (Figure 6, C and D). To analyze the functional relevance of the observed morphologic changes of the peritoneum, we performed a 90-min peritoneal equilibrium test in each group of mice at the last day of treatment. As shown in Figure 6E, the volumes recovered from animals treated with PD were lower than those from saline-treated mice. A partial increase of recovered volumes was obtained in PD fluid-exposed mice treated with Celecoxib.

To evaluate the effect of COX-2 inhibition on the early inflammatory response of the peritoneum, we exposed mice to PD fluid and either treated them or not with Celecoxib for 15 d. The analysis of peritoneal influx of inflammatory cells showed a significant reduction of total cell counts in Celecoxib-treated mice. The decrease of cell infiltration was more evident in macrophages (CD11b⁺), because the reduction of T cells (CD3⁺) did not reach statistical differences (Figure 6F). These results

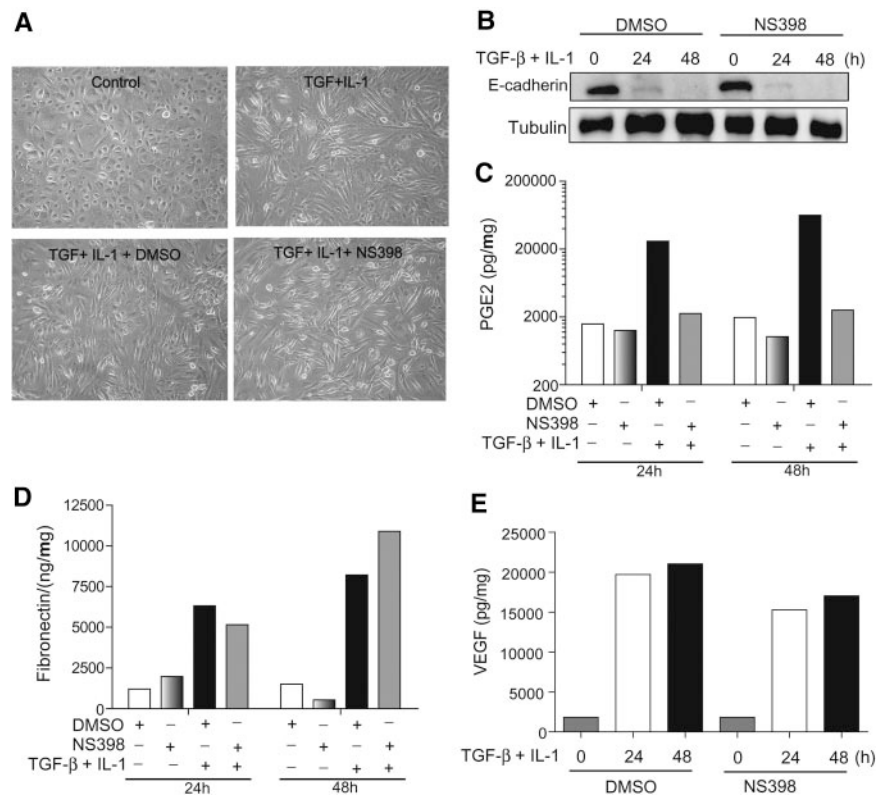


Figure 5. COX-2 inhibition does not affect *in vitro* EMT of MCs induced by TGF- β plus IL-1 β . Omentum-derived MCs were treated for 24 or 48 h with TGF- β plus IL-1 β , in the presence of COX-2 inhibitor (NS398) or vehicle (DMSO). (A) Phase-contrast microscopy shows that COX-2 inhibitor does not prevent nonepithelioid phenotype acquisition of MC at 48 h. (B) Western blot analysis shows that COX-2 inhibition does not prevent E-cadherin downregulation. (C) COX-2 inhibitor prevents PGE₂ upregulation. (D) COX-2 inhibitor does not block the synthesis of fibronectin. (E) COX-2 inhibitor does not affect the production of VEGF. Bars in C through E depict values obtained by ELISA.

demonstrated that COX-2 inhibition ameliorated the deleterious effects of PD fluid exposure of PM by reducing inflammation and fibrosis, which in turn resulted in improved ultrafiltration. The data also indicated that inflammation was an upstream event in peritoneal fibrosis and probably in vessel permeability, and that inflammation-independent mediators operated in new vessel formation.

Exposure to Low-GDP Solution Results in Decreased PM Inflammation and Structural Alteration

Because the incubation of MCs with low-GDP solutions had little impact on EMT and on the expression of COX-2, we analyzed whether the exposure of mouse PM to biocompatible fluids resulted in ameliorated PM worsening. Mice were daily instilled with standard PD fluid or with a solution containing low GDP concentration. The inflammatory response was analyzed at days 7 and 35, and PM thickness was determined at day 35. The analysis of peritoneal influx of inflammatory cells during the time course showed that total cell counts increased in the standard fluid-treated group but not in the group instilled with low-GDP fluid. The number of infiltrating cells in the group treated with low-GDP fluid was significantly smaller than in the standard fluid-treated group at day 35 (Figure 7A). The initial percentage of recruited T lymphocytes (CD3⁺ cells) at day 7 was significantly reduced in the low-GDP fluid-treated group, whereas at day 35, there was no difference among groups (Figure 7B). The recruitment of macrophages (CD11b⁺ cells) was reduced in the group treated with low-GDP fluid at both time points, but the differences among

groups reached statistical significance only at day 35 (Figure 7C). Finally, at day 35, the low-GDP fluid-treated group showed a significant decrease of submesothelial fibrosis compared with the standard fluid-treated group (Figure 7D). These findings demonstrated that mice exposed to PD fluid with low content of GDPs showed less PM worsening.

DISCUSSION

The possible involvement of COX-2 in PM deterioration during PD has remained elusive. Prostaglandins are produced in the peritoneal cavity of PD patients, mostly during peritonitis, and are implicated in increased peritoneal permeability to macromolecules.^{16,17} Interestingly, whereas the inhibition of prostaglandin synthesis, by intraperitoneal administration of indomethacin, results in a decrease of hyperpermeability to macromolecules during peritonitis, it has no effect on permeability in clinically stable and uncomplicated PD patients.^{20,21} These findings suggest that only the augmented prostaglandins, probably those produced by the inducible COX-2, are involved in peritoneal transport dysfunction.

Herein, we demonstrate that effluent MCs with nonepithelioid phenotype show increased expression of COX-2 and that peritoneal transport rate correlates with COX-2 expression levels, suggesting that MCs that have undergone an EMT are an important source of prostaglandins and thus contribute to peritoneal inflammatory response in PD patients. We also show that effluent MC phenotypes and the expression of Snail

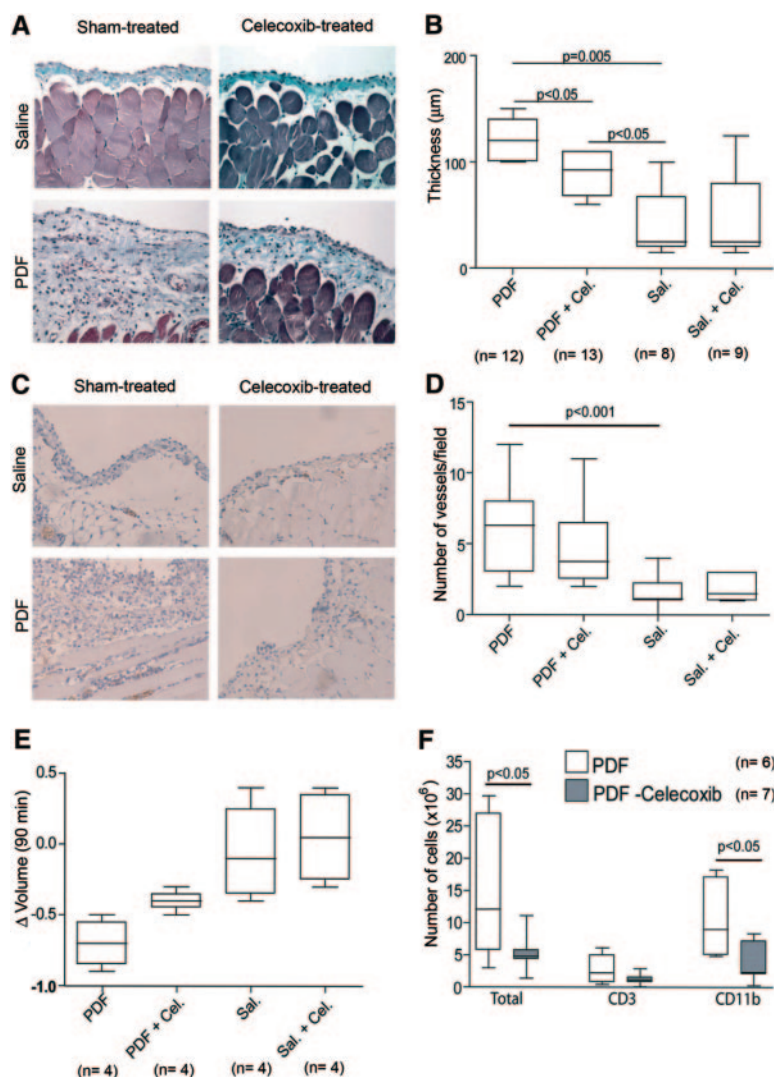


Figure 6. Inhibition of COX-2 ameliorates PD-induced PM worsening. (A and B) Standard PD fluid exposure results in an increase of ECM deposition (A) and thickness (B) of the PM, and Celecoxib treatment significantly reduces these effects, as measured by Masson's trichrome staining. (C and D) CD31 staining of peritoneal samples reveals that PD fluid exposure induces angiogenesis and that Celecoxib treatment does not significantly affect the increase in blood vessel formation. (E) Celecoxib treatment improves PM function (ultrafiltration) of PD fluid-instilled mice. (F) Celecoxib reduces peritoneal inflammation of mice exposed to PD fluid. (A through E) Mice received a daily instillation of PD fluid or saline for 5 wk. After that period, samples were prepared and analyzed as described in the Concise Methods section. (F) For the study of the effect of Celecoxib on PD fluid-induced inflammation, mice were exposed to PD fluid for 15 d. At the end of the experiment, the drained cells were counted and analyzed by flow cytometry. CD3 represents intraperitoneal T lymphocytes and CD11b myeloid cell population. Box plots represent 25th and 75th percentiles and median, minimum, and maximum values.

and COX-2 are associated with the PD fluids used in patients. Treatments with standard PD fluids have a greater impact on EMT of MCs and on the expression of Snail and COX-2 than

treatments with low-GDP solutions or with a combination of standard and icodextrin-based fluids.

That COX-2 upregulation in MCs paralleled that of the EMT inducer Snail prompted us to analyze whether it could play a role in the transdifferentiation process of these cells; however, *in vitro* experiments demonstrated that inhibition of COX-2 did not prevent TGF- β plus IL-1-induced EMT of MCs and did not affect the expression of EMT-associated molecules. In contrast, it was recently shown that in MCs stimulated with high glucose, the inhibition of COX-2 prevented TGF- β and ECM upregulation.²² An explanation to these apparent discrepancies could be that the inhibition of COX-2 *in vitro* prevents the indirect effect of high glucose on ECM production, *via* inhibition of TGF- β synthesis,²² but not the direct effect of inflammatory cytokines on the EMT of MCs.

We demonstrate that Celecoxib treatment preserves the PM of PD fluid-instilled mice. Because inflammation is an early response of peritoneum to PD fluid-mediated insult, the beneficial effect of Celecoxib could be a consequence of its anti-inflammatory properties.⁹ It is known that tissue injuries in adult mammals caused by traumas or surgeries induce inflammation and scar formation as a consequence of an imperfect healing process.²³ In contrast, during the fetal period or soon after birth, injury-induced inflammatory response is weak and the healing takes place without scar formation.²³ In addition, it has been shown that mice deficient in macrophages, neutrophils, and mast cells (PU.1 null mice) are impaired to mount a standard inflammatory response and show scar-free healing.²⁴ Thus, the participation of inflammation in tissue repair does not seem to be essential.²⁵ It is tempting to speculate that the inhibition of inflammation, by Celecoxib treatment, contributes to the reduction of peritoneal fibrosis in mice exposed to PD fluid. Our data indicate that PD fluid-induced angiogenesis is only slightly reduced in mice treated with Celecoxib. This may be explained by the fact that not only inflammatory cells but also injured MCs are able to produce different proangiogenic factors^{26,27}; therefore, whereas Celecoxib treatment may block the production of angiogenic factors by inflammatory cells, it has no effect on the synthesis of these factors by MCs. In addition, under stress conditions, resident peritoneal fibroblasts may account for the production of angiogenic factors.^{28,29} The partial recovery of PM function in animals exposed to PD fluid and treated with Celecoxib might be explained by the inhibition of PGE₂ synthesis, which results in decreased vascular permeability.⁸ Our findings are further supported by the fact that mice exposed to low-GDP fluid, which does not induce EMT

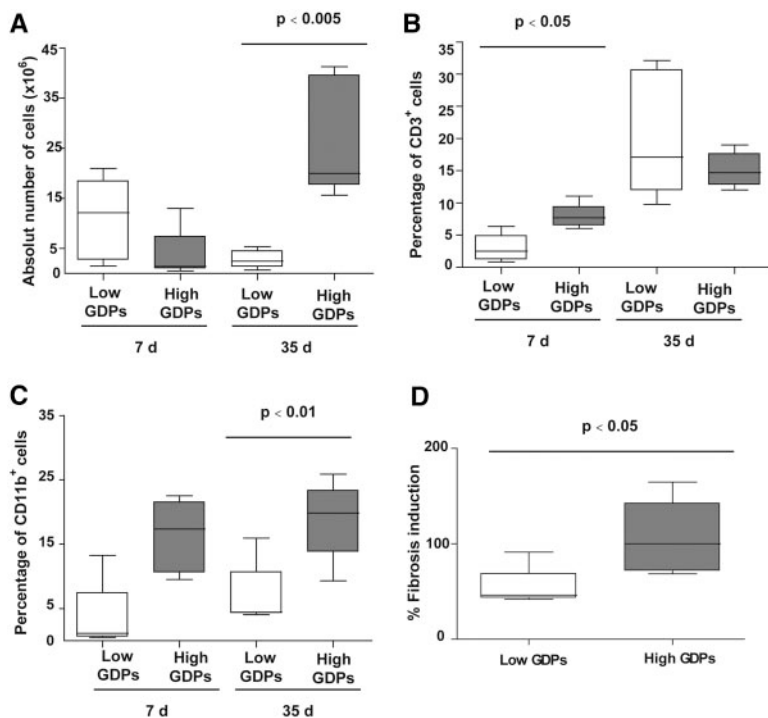


Figure 7. Exposure to low-GDP solution results in decreased PM worsening. Mice (11 per group) were daily instilled with 1.5 ml of low GDP solution (□) or standard PD fluid containing high GDPs (■), both composed of 4.25% glucose. (A) Total peritoneal influx of inflammatory cells was analyzed by flow cytometry at days 7 (five mice per group) and 35 (six mice per group). (B and C) The percentages of CD3⁺ cells (T lymphocytes) and CD11b⁺ cells (macrophages) were also determined by flow cytometry at days 7 and 35. (D) Peritoneal thickness was measured at day 35, and results are depicted as percentage of fibrosis induction, 100% being the mean value of the high-GDP group. Box plots represent 25th and 75th percentiles and median, minimum, and maximum values.

of MCs and COX-2 expression *in vitro*, show fewer infiltrating inflammatory cells and decreased fibrosis than mice treated with standard fluid, demonstrating the benefit of using bio-compatible PD solutions.

The results presented in this work indicate that inflammation is an early response to PD fluid exposure, which in turn leads to peritoneal fibrosis, whereas angiogenesis does not seem to be entirely dependent on inflammatory reaction. The inhibition of COX-2 or the prevention of its expression by using biocompatible PD fluids may ameliorate the deleterious effect of PD on PM, by reducing inflammation, ECM accumulation, and thickness, which results in improved ultrafiltration. We are aware that COX-2 inhibitors cannot be easily used in clinical practice, at least for long-term treatments, because major concerns about the cardiovascular safety of these drugs have been raised.³⁰ This issue is particularly important in patients with ESRD, which have prevalent cardiovascular risk³¹; however, we believe that our results provide evidence about the feasibility of considering inflammation as a potential therapeutic target to ameliorate PD-related PM deterioration. Further studies of peritoneal inflammatory reaction will provide

more specific interventions with minimum adverse effects on cardiovascular risk.

CONCISE METHODS

Patients

We included 23 clinically stable PD patients: 12 men and 11 women. The causes of renal failure were nephrosclerosis ($n = 6$), glomerulonephritis ($n = 6$), diabetes ($n = 4$), chronic pyelonephritis ($n = 2$), polycystic kidney disease ($n = 1$), unknown cause ($n = 2$), and other causes ($n = 2$). The baseline characteristics of the patients and the differences between the subgroups according to the phenotype of effluent MCs are shown in Table 1. The age of patients ranged from 21 to 83 yr (mean 67.88 ± 14.60). The mean period PD was 9.47 ± 7.44 mo (range 3 to 25). Most patients (21 of 23) received recombinant human erythropoietin during this study. The duration of active peritoneal inflammation was defined as the time (days) from elevation of cell count in PD effluent until normalization of cell count. Three patients showed peritonitis, and two experienced hemoperitoneum. All of the patients who experienced peritonitis or hemoperitoneum drained nonepithelioid MCs in the effluents. For these patients, at least 3 mo passed after the resolution of the pathologic conditions before sampling the effluent-derived MC. Peritoneal glucose load was calculated by the sum of glucose contained in each PD-fluid bag during the whole time on PD. urea-MTC and Cr-MTC were measured using standard methods.³² Ultrafiltration capacity was defined by a peritoneal exchange of 4 h using 3.86% glucose.³³

At the moment of effluent-derived MC sampling, seven patients were on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and 16 were on APD. Fourteen patients (five on CAPD and nine on APD) were treated with standard solution based on glucose and lactate, containing high GDP concentration (Dianeal; Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL). Seven of these patients (five on CAPD and two on APD) received one long dwell per day (generally overnight) with icodextrin-containing solution (Extraneal; Baxter). Nine patients (two on CAPD and seven on APD) were treated with low-GDP solutions buffered with lactate in five cases (Balance; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) or bicarbonate in four cases (BicaVera; Fresenius). The distribution of patients according to PD techniques and PD fluids is shown in Supplemental Table S1.

This study abides by the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spain). Written consent was obtained from the PD patients included in this study to use effluent samples. Oral informed consent was obtained from omentum donors submitted to elective surgeries.

Culture of MCs and Reagents

MCs were obtained from PD effluents and from omentum samples using the methods described previously.³⁴ To standardize effluent MC harvesting in the high-GDP group ($n = 14$), we obtained the cells

from a long dwell (generally overnight) with a PD fluid containing 2.27% glucose (Dianeal; Baxter). Effluent MCs from the low-GDP group were isolated from a long dwell with fluids containing 2.3% glucose and buffered with lactate ($n = 5$; Balance; Fresenius) or with bicarbonate ($n = 4$; BicaVera; Fresenius). From each patient, at least three independent effluent MC samples were obtained in a period of 2 mo, which showed phenotype stability, and one representative MC culture per patient was used in the study. All cells were cultured in Earle's M199 medium, supplemented with 20% FCS, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 2% Biogro-2 (Biologic Industries, Ashrat, Israel). The purity of effluent and omentum-derived MC cultures was determined by the expression of standard mesothelial markers: Intercellular adhesion molecule 1, cytokeratins, and calretinin. These MC cultures were negative for von Willebrand factor excluding endothelial cell contamination.³⁴

To induce EMT *in vitro*, we treated omentum-derived MC for 24 or 48 h with a combination of human recombinant TGF- β (0.5 ng/ml) and IL-1 β (2 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), which has been proved to be a good model of EMT *in vitro*.^{4,6} When indicated, the selective COX-2 inhibitor NS398 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) was used at a final concentration of 20 μ M. Wound-healing studies were carried out as described previously by performing a mechanical injury with a 1.5-mm cell scraper.⁶ To analyze the effect of GDPs on EMT and COX-2 expression, omentum-derived MC were incubated for 24 or 48 h with standard PD fluid composed of 4.25% glucose and buffered with lactate (Stay Safe; Fresenius) or low-GDP solutions composed of 4.25% glucose and buffered with lactate or bicarbonate (Balance or BicaVera; Fresenius) diluted one half with culture medium.

RNA Extraction and Reverse Transcription-PCR

Total RNA was extracted by using RNeasy (Ambion, Austin, TX), and the complementary DNA was obtained from 1 μ g of total RNA by reverse transcription following the manufacturer's recommendation (Applied Biosystems, Cheshire, UK). COX-2 mRNA was amplified with a LightCycler using a SYBR Green Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and the specific primer set 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3' and 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3' as described previously.³⁵ Snail mRNA was amplified using similar conditions and the following primer set: 5'-CACATCCTTCTCACTGCCATG-3' and 5'-GCATCTAACTCTAGTCTGC-3'. β -Actin was amplified using commercial primers (Clontech, Palo Alto, CA). Annealing temperatures for the COX-2, Snail, and β -actin PCR were 56, 53, and 60°C, respectively. All samples were normalized with respect to the value obtained for β -actin.

Western Blot Analysis and Enzyme-Linked Immunoassays

For Western blotting, MC cultures were lysed in a buffer (1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS), and total protein was quantified using a total protein assay kit (Pierce, Cambridge, MA). MC proteins (50 μ g) were resolved in 8 to 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, which were blocked with fat-free milk and then incubated with specific antibodies against

COX-2, fibronectin, collagen I, E-cadherin, and α -tubulin (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Membranes were incubated with goat anti-mouse IgG antibody conjugated with peroxidase (Pharmingen, San Diego, CA) and developed with enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Blot images were acquired with an LAS-1000 charged coupled device camera (Fujifilm, Cedex, France).

For the detection of VEGF and PGE₂ in culture supernatants, the media of MCs cultured under the various conditions were replaced, and 18 h later supernatants were collected and stored at -80°C until their analysis. The concentrations of VEGF and PGE₂ in supernatants were assessed by a standard ELISA kit (R&D Systems). The production of fibronectin under various conditions was measured in cell lysates by ELISA as recommended by the manufacturer (Biomedical Technologies, Stoughton, MA).

Peritoneal Exposure Model in Mice

A total of 112 female C57BL/6 mice with age between 12 and 16 wk were used in this study (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). The experimental protocol was in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the Animal Ethics Committee of the Unidad de Cirugía Experimental of Hospital Universitario La Paz.

A customized vascular access port (Access Technologies, Skokie, IL) was implanted subcutaneously, and the catheter end was introduced into the peritoneal cavity by a chirurgic procedure. During the week of recovery, animals received daily 0.2 ml of saline solution containing 1 U/ml heparin. Thereafter, mice were subdivided into different groups. For histologic and functional analysis, 70 mice were used: 20 were daily instilled with 1.5 ml of standard PD fluid composed of 4.25% glucose and buffered with lactate (Stay Safe; Fresenius) and orally treated with vehicle (PDF group), 20 were instilled with PD fluid and orally treated with Celecoxib (2 μ g/g body wt; PDF + Cel group), 15 were daily instilled with 1.5 ml of physiologic saline and orally treated with vehicle (Sal group), and 15 were instilled with physiologic saline and orally treated with Celecoxib (Sal + Cel group). Mice were treated with different conditions for 5 wk. The whole study was performed in four separate experiments. In one experiment, a peritoneal equilibrium test was performed during the last day of treatment with the various conditions. Mice were instilled with 1.5 ml of PD solution; 90 min later, animals were killed and the total peritoneal volumes were collected. The peritoneal net volume was determined by the difference between instilled and recovered volumes. For histologic analyses, specimens of the parietal peritoneum were collected. Sample were fixed in neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, cut into 5- μ m sections, and stained either with hematoxylin and eosin or Masson's trichrome. The thickness of submesothelial tissue was determined by blinded microscope analysis using a metric ocular. The presence of blood vessels was determined by immunostaining with an anti-CD31 mAb (Becton Dickinson). Blood vessels of five fields per mouse sample were counted, and the median was used for statistical analysis.

To analyze the effect of Celecoxib in early inflammatory response to PD fluid exposure, we used 20 mice. Mice (10 per group) were daily instilled with 1.5 ml of standard PD solution (Stay Safe; Fresenius)

and orally treated with Celecoxib or vehicle alone during 15 d. Then, the peritoneal influx of inflammatory cells was analyzed by flow cytometry using anti-CD11b and anti-CD3 mAb (Becton Dickinson).

During these experiments, the percentages of dropouts were similar in all of the groups (approximately 40%), the main cause being catheter damage produced by the mouse itself and not as a consequence of treatments. There were no significant differences in weight gain among the various groups.

To compare the effects of PD fluids with different contents of GDPs on PM inflammation and fibrosis, we used 22 mice. Mice (11 per group) were daily instilled with 1.5 ml of standard PD fluid composed of 4.25% glucose and lactate (Stay Safe; Fresenius) or with low-GDP solution composed of 4.25% glucose and bicarbonate (BicaVera; Fresenius). The peritoneal influx of inflammatory cells was analyzed by flow cytometry at days 7 (five mice per group) and 35 (six mice per group). Peritoneal thickness was also determined at day 35. In this experiment, no dropout was observed as a result of technical improvement of surgical implantation of catheters.

Statistical Analysis

Results are given as means \pm SD (Table 1). Figures 1, B through F, 2A, and 4B represent means \pm SE. Comparisons between data groups were performed using the nonparametric Mann-Whitney rank sum *U* test. Linear correlation was determined by Spearman regression analysis (Figures 1D, 2B, and 4A). χ^2 and two-tailed Fisher exact tests were used to compare qualitative variables. $P < 0.05$ was considered statistically significant. We used SPSS 14.5 (Chicago, IL) and GraphPad Prism 4.0 (La Jolla, CA).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2007-61201 and PET2006-0256 from Ministerio de Educación y Ciencia to M.L.-C. and FIS PI 06/0098 and RETICS 06/0016 from Fondo Investigaciones Sanitarias to R.S. This work was also partially supported by Fresenius Medical Care and Gambro Europe.

We thank the nurses from the peritoneal dialysis units for help in recompilation of peritoneal effluents and omental samples. We also thank Javier Benito de la Víbora, DVM, and Carlota Largo Aramburu, DVM, PhD, for the assistance with mouse care.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Krediet RT: The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 55: 341–356, 1999
- Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, Selgas R, Lopez-Cabrera M: Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: Pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol* 18: 2004–2013, 2007
- Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT: Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 470–479, 2002
- Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Cirugeda A, Bajo MA, del Peso G, Sanchez-Tomero JA, Jimenez-Heffernan JA, Lopez-Cabrera M: Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: Role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 46: 938–948, 2005
- Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, Ramirez M, Gamallo C, Sanchez-Tomero JA, Alvarez V, Lopez-Cabrera M, Selgas R: Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 444: 247–256, 2004
- Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirugeda A, Gamallo C, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M: Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 348: 403–413, 2003
- Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, Kelly MM: Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 16: 425–436, 2005
- Yang AH, Chen JY, Lin JK: Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 63: 1530–1539, 2003
- Turini ME, DuBois RN: Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu Rev Med* 53: 35–57, 2002
- Gately S, Li WW: Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: A target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 31: 2–11, 2004
- Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG: Eicosanoids in inflammation: Biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem* 7: 311–340, 2007
- Bonner JC, Rice AB, Ingram JL, Moomaw CR, Nyska A, Bradbury A, Sessoms AR, Chulada PC, Morgan DL, Zeldin DC, Langenbach R: Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *Am J Pathol* 161: 459–470, 2002
- Cheng HF, Wang CJ, Moeckel GW, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC: Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int* 62: 929–939, 2002
- Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M: Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 95: 1861–1868, 1995
- Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M: JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* 125: 556–571, 2003
- Steinhauer HB, Schollmeyer P: Prostaglandin-mediated loss of proteins during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 29: 584–590, 1986
- Zemel D, Koomen GC, Hart AA, ten Berge IJ, Struijk DG, Krediet RT: Relationship of TNF- α , interleukin-6, and prostaglandins to peritoneal permeability for macromolecules during longitudinal follow-up of peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* 122: 686–696, 1993
- Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 278: 34834–34844, 2003
- Sitter T, Haslinger B, Mandl S, Fricke H, Held E, Sellmayer A: High glucose increases prostaglandin E2 synthesis in human peritoneal

- mesothelial cells: role of hyperosmolarity. *J Am Soc Nephrol* 9: 2005–2012, 1998
20. Douma CE, de Waart DR, Zemel D, Struijk DG, Krediet RT: Prostaglandin inhibition by intraperitoneal indomethacin has no effect on peritoneal permeability during stable CAPD. *Nephrol Dial Transplant* 16: 803–808, 2001
 21. Zemel D, Struijk DG, Dinkla C, Stolk LM, ten Berge IJ, Krediet RT: Effects of intraperitoneal cyclooxygenase inhibition on inflammatory mediators in dialysate and peritoneal membrane characteristics during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* 126: 204–215, 1995
 22. Liu H, Peng Y, Liu F, Li J, Chen X, Liu Y, Zhang H: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases transforming growth factor-beta1 synthesis and matrix production in human peritoneal mesothelial cells. *Cell Biol Int* 31: 508–515, 2007
 23. Ferguson MW, O’Kane S: Scar-free healing: From embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 839–850, 2004
 24. Martin P, D’Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR: Wound healing in the PU.1 null mouse: Tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 13: 1122–1128, 2003
 25. Martin P, Leibovich SJ: Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 15: 599–607, 2005
 26. Lai KN, Lai KB, Lam CW, Chan TM, Li FK, Leung JC: Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 35: 644–652, 2000
 27. Lai KN, Tang SC, Leung JC: Mediators of inflammation and fibrosis. *Perit Dial Int* 27[Suppl 2]: S65–S71, 2007
 28. Giatromanolaki A, Kotsiou S, Koukourakis MI, Sivridis E: Angiogenic factor expression in hepatic cirrhosis. *Mediators Inflamm* 2007: 67187, 2007
 29. Tunyogi-Csapo M, Koreny T, Vermes C, Galante JO, Jacobs JJ, Glant TT: Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis. *J Orthop Res* 25: 1378–1388, 2007
 30. Harris RC, Breyer MD: Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 236–245, 2006
 31. Garcia-Lopez E, Carrero JJ, Suliman ME, Lindholm B, Stenvinkel P: Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 27[Suppl 2]: S205–S209, 2007
 32. Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, Borrego F, Jimenez C, Del Peso G, De Alvaro F: Functional longevity of the human peritoneum: How long is continuous peritoneal dialysis possible? Results of a prospective medium long-term study. *Am J Kidney Dis* 23: 64–73, 1994
 33. Ho-dac-Pannekeet MM, Atasever B, Struijk DG, Krediet RT: Analysis of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients by means of standard peritoneal permeability analysis. *Perit Dial Int* 17: 144–150, 1997
 34. Lopez-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Jimenez-Heffernan JA, Bajo MA, del Peso G, Sanchez-Tomero JA, Selgas R: Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* 26: 26–34, 2006
 35. Lara-Pezzi E, Gomez-Gaviro MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M, Martinez AC, Arroyo AG, Lopez-Cabrera M: The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 110: 1831–1838, 2002

Supplemental information for this article is available online at <http://www.jasn.org/>.

ORIGINAL ARTICLES

LONG-TERM INTERVENTION WITH HEPARINS IN A RAT MODEL OF PERITONEAL DIALYSIS

Margot N. Schilte,¹ Jesus Loureiro,^{1,2} Eelco D. Keuning,¹ Piet M. ter Wee,³
Johanna W.A.M. Celie,¹ Robert H.J. Beelen,¹ and Jacob van den Born^{1a}

Department of Molecular Cell Biology and Immunology,¹ VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; Department of Molecular Biology,² University Hospital La Princesa, Madrid, Spain; Department of Nephrology,³ VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

◆◆**Background:** Peritoneal dialysis (PD) is associated with functional and structural alterations of the peritoneal membrane, particularly new vessel formation and fibrosis. In addition to anticoagulant effects, heparin displays anti-inflammatory and angiostatic properties. Therefore, the effects of administration of heparins on function and morphology of the peritoneal membrane were studied in a rat PD model.

◆◆**Methods:** Rats received 10 mL conventional PD fluid (PDF) daily, with or without the addition of unfractionated heparin (UFH) or low molecular weight heparin (LMWH) in the PDF (1 mg/10 mL intraperitoneally) via a mini access port. Untreated rats served as controls. After 5 weeks, a 90-minute functional peritoneal transport test was performed and tissues and peritoneal leukocytes were taken.

◆◆**Results:** PD treatment induced loss of ultrafiltration ($p < 0.01$), a twofold increase in glucose absorption ($p < 0.03$), increased urea transport ($p < 0.02$), and loss of sodium sieving ($p < 0.03$), which were also found in the PDF + heparin groups. Increased peritoneal cell influx and hyaluronan production ($p < 0.02$) as well as an exchange of mast cells and eosinophils for neutrophils after PD treatment were observed in PD rats; addition of heparin did not affect those changes. Mesothelial regeneration, submesothelial blood vessel and matrix formation, and accumulation of tissue macrophages were seen in PD animals. Spindle-shaped vimentin-positive and cytokeratin-negative cells indicated either partial injury and denudation of mesothelial cells or epithelial-to-mesenchymal transition. Neither UFH nor LMWH affected any of these morphological changes.

◆◆**Conclusion:** Within 5 weeks, PD treatment induces a chronic inflammatory condition in the peritoneum, evidenced by high transport, leukocyte recruitment, tissue remodeling, and induction of spindle-shaped cells in the mesothelium. Addition of LMWH or UFH to the PDF did not prevent these adverse PDF-induced peritoneal changes.

Perit Dial Int 2009; 29:26–35

www.PDIConnect.com

KEY WORDS: Angiogenesis; epithelial-to-mesenchymal transition; fibrosis; heparin; mesothelium; morphology; peritoneal transport.

Peritoneal dialysis (PD) is an effective treatment for patients with end-stage renal failure. During this treatment, the peritoneal membrane functions as a dialyzing organ and is constantly exposed to PD fluid (PDF). It is well known that long-term PD induces loss of mesothelial cells, submesothelial thickening, and neo-angiogenesis (1). The nonphysiological environment in peritoneum caused by chronic PDF instillation sustains low-grade of sterile inflammation (1). This low-grade inflammatory state may, in time, cause functional deterioration of the peritoneal membrane, with increasing peritoneal permeability to small solutes and reduced ul-

Correspondence to: M.N. Schilte, Department of Molecular Cell Biology and Immunology, H269, VU University Medical Center, Van der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam, The Netherlands.

m.schilte@vumc.nl

Received 7 January 2008; accepted 1 May 2008.

^a Now at Department of Nephrology, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands.

trafiltration capacity (2,3). At the molecular level there is increasing evidence that cytokines, chemokines, and growth factors play key roles in regulating and sustaining this proinflammatory condition (4). After long-term PD treatment, peritoneal mesothelial cells show a progressive loss of the epithelial phenotype and acquire fibroblast-like characteristics, suggesting epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (5).

Heparin is a highly sulfated polysaccharide belonging to the glycosaminoglycan family and is synthesized by mast cells. Although it is most known for its anticoagulant effect, heparin has a number of immunomodulatory and anti-inflammatory activities, including binding of cytokines, chemokines, and growth factors (6). Earlier reports demonstrated that heparin can inhibit leukocyte rolling along the vessel wall, a process known to involve selectins (7,8). The function of selectins in this process depends on recognition of specific glycoprotein ligands. However, a variety of carbohydrate structures, including heparin, may bind these lectin-like molecules and interfere with ligand binding (9). In addition to unfractionated heparin (UFH), low molecular weight heparin (LMWH) is one of the most commonly used types of heparin in clinical settings. Fractions of LMWH are prepared from standard UFH and are similar to UFH in many aspects. The main advantages of this class of antithrombotic agent compared with UFH are improved bioavailability, prolonged half-life (which may permit one single daily subcutaneous injection), and improved efficacy (10,11).

In the clinical PD setting, heparin is used to prevent catheter obstruction and the formation of fibrin during peritonitis. Results of studies on the effects of intraperitoneal heparin administration on peritoneal transport and inflammation have been contradictory (12–16). Therefore, we studied the effects of long-term addition of UFH, as well as LMWH, to the PDF on function, defense, and tissue remodeling of the peritoneal membrane to determine whether heparin can improve peritoneal transport and whether it can also prevent morphological changes in peritoneal tissues. In the present study, either UFH or LMWH was added to the PDF for 5 weeks in a chronic peritoneal exposure model in the rat (17,18).

MATERIAL AND METHODS

ANIMALS

Male Wistar rats (Harlan CPB, Horst, The Netherlands) weighing 250 – 275 g at the beginning of the experiment were used throughout the study. They were allowed 1 week of acclimatization before the start of the experi-

ment. Animals were housed under conventional laboratory conditions and were given food and water *ad libitum*. The Animal Experimental Committee of the Vrije Universiteit of Amsterdam approved the experimental design.

EXPERIMENTAL DESIGN

Fluids were instilled via a peritoneal catheter connected to an implanted subcutaneous mini access port, as previously described (19). Rats that were not surgically treated and received no fluid instillation served as the control group ($n = 8$). The rest of the animals ($n = 34$) received 2 mL saline with 1 IU/mL heparin to allow wound healing during the first week after their operation. Thereafter, during a 5-week period (20–23), rats were instilled daily with 10 mL standard PDF (Dianeal PD4, 3.86% glucose, pH 5.2; Baxter R&D, Utrecht, The Netherlands; PDF-control; $n = 14$), PDF with the addition of UFH (PDF-UFH; $n = 10$), or PDF with the addition of LMWH (nadroparin calcium; PDF-LMWH; $n = 10$). The concentrations used for UFH and LMWH (1 mg/rat/day; equivalent to 175 IU UFH/rat/day and 100 IU LMWH/rat/day) are consistent with the concentrations used in the clinical setting and proportional to the dose used in deep venous thrombosis prophylaxis in humans (24). To check whether the animals were not over-heparinized due to daily heparin administration, blood samples were taken after 4 weeks of treatment 3 hours after PDF + heparin instillation to measure APTT clotting times and anti-factor Xa levels. At the end of the experiment, a functional 90-minute peritoneal equilibrium test (PET) was performed (see below) under a mixture of fentanyl-fluanisone (0.05 mL/100 g) and midazolam (0.08 mL/100 g) anesthesia. After the animals were sacrificed, tissues and peritoneal leukocytes were taken to analyze functional, morphological, and cellular parameters.

ANALYSIS OF PERITONEAL CELLS AND EFFLUENTS

After 5 weeks of treatment, a PET was performed by injecting 30 mL standard PDF into the peritoneal cavity via a direct intraperitoneal catheter (Venflon Pro; BD Medical Systems, Franklin Lakes, NJ, USA). After 90 minutes, the PDF was drained and ultrafiltration capacity was calculated. Cells were isolated by centrifugation and cell number, and viability was determined by trypan blue exclusion. Cytocentrifuge preparations were stained with May–Grünwald–Giemsa and cells were differentiated. After the PET, the animals were sacrificed and a cardiac puncture was performed. Glucose, sodium, creatinine, and urea concentrations were analyzed in serum samples

and in the cell-free effluents at $t = 90$ minutes of the PET. At $t = 0$ and $t = 45$ minutes, sodium concentrations in the effluents were analyzed to measure sodium sieving. The amount of hyaluronic acid in the supernatant of the peritoneal effluent was determined using an ELISA-based assay according to Fosang *et al.* (25).

MORPHOLOGIC ANALYSIS

Mesentery and Omentum: A part of omental and mesenteric tissue was dissected and spread on a glass slide for fluorescence microscopic examination. Both tissues were stained with antibodies to CD31 (PECAM; Serotec, Oxford, United Kingdom) to visualize vasculature and to ED2 (Serotec) to visualize macrophages. As a negative control, conjugate controls (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) without the first antibody were used. Images were analyzed by computerized digital image analysis (AnalySIS; Soft Imaging System; Olympus, Hamburg, Germany). The areas positive for CD31 and ED2 were calculated as percentages of the total area of the tissue.

Parietal Peritoneum: The parietal peritoneum was taken at the contralateral side to the tip of the implanted catheter using a standardized method. Cryostat sections (7 μm) were cut and stained for CD31 and ED2. Images were analyzed by computerized digital image analysis and the areas positive for CD31 and ED2 were calculated as percentages of the total area of the submesothelial matrix layer. Frozen sections were also used to quantify fibrosis formation. The thickness of the submesothelial extracellular matrix was determined after Van Gieson staining (Merck, Darmstadt, Germany) as the mean of 10 independent measurements for each animal.

Liver Imprints: Imprints of the mesothelial monolayer of the liver were taken with 3% gelatin-coated slides according to a previously described method (26) and stained with May-Grünwald-Giemsa. Mesothelial cell density per 0.1 mm^2 area was counted using a scored eyepiece; the mean of 15 areas was calculated for each slide and expressed as cells per square millimeter. Liver imprints were also stained for vimentin (Serotec) and cytokeratin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) to determine spindle-shaped cells that underwent EMT.

STATISTICAL ANALYSIS

All data are presented as median and interquartiles. The Kolmogorov-Smirnov test for normality showed that the groups were not normally distributed; therefore, differences between groups were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney U-test. We made three comparisons, namely, control versus PDF-control,

PDF-control versus PDF-UFH, and PDF-control versus PDF-LMWH. According to a Bonferroni correction, probability values of $p < 0.03$ were considered significant. Correlation analysis was performed using the nonparametric Spearman's rho test. Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method.

RESULTS

During the experiment, the well-being of all animals was monitored daily and no apparent abnormalities were observed. Throughout the experiment a number of animals dropped out due to abdominal fat or omental tissue wrapping around the tip of the catheter, which was consistent with earlier experience (17,20). Although it was expected that heparin would impair fibrin formation and possibly prevent adhesion and omental wrapping, Kaplan-Meier survival analysis showed no differences in dropout rates (in time or in number) between the three treatment groups. Development of peritonitis during the experiment was very unlikely since there was no loss of body weight, the animals did not show any other clinical signs, and there were no abnormalities in neutrophil counts in peritoneal dialysates or in peritoneal tissues. After 5 weeks of fluid instillation, 8, 5, and 5 rats in the PDF-control, PDF-UFH, and PDF-LMWH groups, respectively, remained for analysis. All 8 control rats were used for the PET and morphologic analysis. APTT and anti-factor Xa measurements showed that daily intraperitoneal treatment with clinical concentrations of 1 mg/day heparin did not significantly influence clotting times 3 hours after heparin injection. Plasma anti-factor Xa levels were higher in the PDF-LMWH group compared to the control groups ($p = 0.048$). Although this difference was not significant, it indicated that heparin was administered in an adequate dose without over-heparinization of the animals.

TRANSPORT PARAMETERS AND COMPOSITION OF PERITONEAL CELLS

Table 1 shows the transport parameters measured in the PET effluents at $t = 90$ minutes for all four groups. The PET in the control animals demonstrated a net ultrafiltration capacity of 8.6 mL per 90 minutes. Exposure to PDF reduced peritoneal performance significantly to a net ultrafiltration volume of 6.5 mL. Addition of UFH or LMWH further reduced the ultrafiltration capacity. In addition to the reduced net ultrafiltration capacity, PDF induced a significantly enhanced glucose absorption ($p < 0.03$) and an increased urea transport ($p < 0.02$). Sodium measurements at $t = 0$, $t = 45$, and $t = 90$ minutes of

TABLE 1
Values of Peritoneal Transport Parameters Determined by Peritoneal Equilibrium Test

	Control	PDF-control	PDF-UFH	PDF-LMWH
Net ultrafiltration volume (mL/90 min)	8.6±1.8 ^a	6.5±3.0	5.0±3.9	3.8±3.1
Glucose at <i>t</i> =90 (mmol/L)	113.4±32.0 ^b	68.5±26.9	73.8±12.5	70.3±13.5
Glucose absorption (%)	27.9±19.8 ^b	58.5±19.3	59.4±10.8	60.4±12.5
Creatinine at <i>t</i> =90 (μmol/L)	48.5±9.5	46.0±7.0	45.0±10.0	48.0±15.0
Urea at <i>t</i> =90 (mmol/L)	3.9±1.1 ^a	5.0±1.9	5.6±1.6	4.8±0.8
Sodium at <i>t</i> =0 (mmol/L)	129.5±8.8	129.5±9.5	131.0±22.0	130.0±2.0
Sodium at <i>t</i> =45 (mmol/L)	121.5±3.8	121.0±7.0	120.0±17.0	122.0±10.0
Sodium at <i>t</i> =90 (mmol/L)	112.0±20.5 ^c	123.0±16.5	118.0±17.0	122.0±20.5

PDF = peritoneal dialysis fluid; UFH = unfractionated heparin, added to PDF; LMWH = low molecular weight heparin, added to PDF.

^a *p* < 0.02: control versus PDF-control.

^b *p* < 0.04: control versus PDF-control.

^c *p* < 0.03: control versus PDF-control.

All data are presented as median±interquartiles.

the PET showed a reduction in the sodium dip upon PDF treatment (control vs PDF-control at *t* = 90: *p* < 0.03). Addition of UFH or LMWH did not restore PDF-induced changes in peritoneal transport (Table 1).

The total cell numbers and differentiation of peritoneal cells recovered from the PET dialysate are shown in Table 2. Significantly more cells were found in the peritoneal effluents of the three PDF-treated groups compared to the control animals (*p* < 0.02). No difference in cell numbers was seen between PDF-control and the heparin groups. Cell differentiation revealed an exchange of mast cells and eosinophils for neutrophils after PD treatment. Treatment with UFH as well as LMWH seemed to nearly abolish the PD-induced inflammation by reducing neutrophil recruitment. Furthermore, the addition of UFH or LMWH resulted in slightly reduced hyaluronan synthesis compared to the PDF-control group (Table 2).

MORPHOLOGICAL CHANGES

Mesentery and Omentum: All groups exposed to PDF showed a significant increase (*p* < 0.01) in accumulation of mature macrophages (ED2) and new blood vessel formation (CD31) compared to the control group (Figure 1). Neither UFH nor LMWH was able to prevent the increased density of macrophages and blood vessels seen in the mesentery and omentum. When all four groups were combined, the increased accumulation of macrophages was positively correlated to increased blood vessel density: *r* = 0.64 and *r* = 0.89 for mesentery and omentum respectively; both *p* < 0.01.

Parietal Peritoneum: Frozen sections of the peritoneum were stained with Van Gieson to observe changes in the extracellular matrix underneath the mesothelial layer. Peritoneum taken from control animals showed

TABLE 2
Composition of Peritoneal Leukocytes and Hyaluronic Acid Synthesis

	Control	PDF-control	PDF-UFH	PDF-LMWH
Total cell count (×10 ⁶)	23.5±3.6 ^a	214.5±51.7	186.5±48.8	214.6±54.7
Macrophages (%)	72.8±6.1	65.6±35.7 ^b	79.8±9.6	86.25±13.1
Lymphocytes (%)	0.5±0.7	0.8±0.5	1±0.6	0.6±1.2
Neutrophils (%)	2.4±1.7 ^a	27.3±31.4	17.5±11.3	12.1±14.9
Eosinophils (%)	11.5±3.3 ^a	4.6±8.1	0.5±1.9	0.6±1.2
Mast cells (%)	12.25±5.5 ^a	0.1±0.3	0.3±0.4	0±0.2
Hyaluronan (ng/mL)	21.4±24.6 ^a	2424.9±2896.8	2171.8±1643.6	1190.4±904.2

PDF = peritoneal dialysis fluid; UFH = unfractionated heparin, added to PDF; LMWH = low molecular weight heparin, added to PDF.

^a *p* < 0.02: control versus PDF-control.

^b *p* < 0.05: PDF-control versus PDF-LMWH.

All data are presented as median±interquartiles.

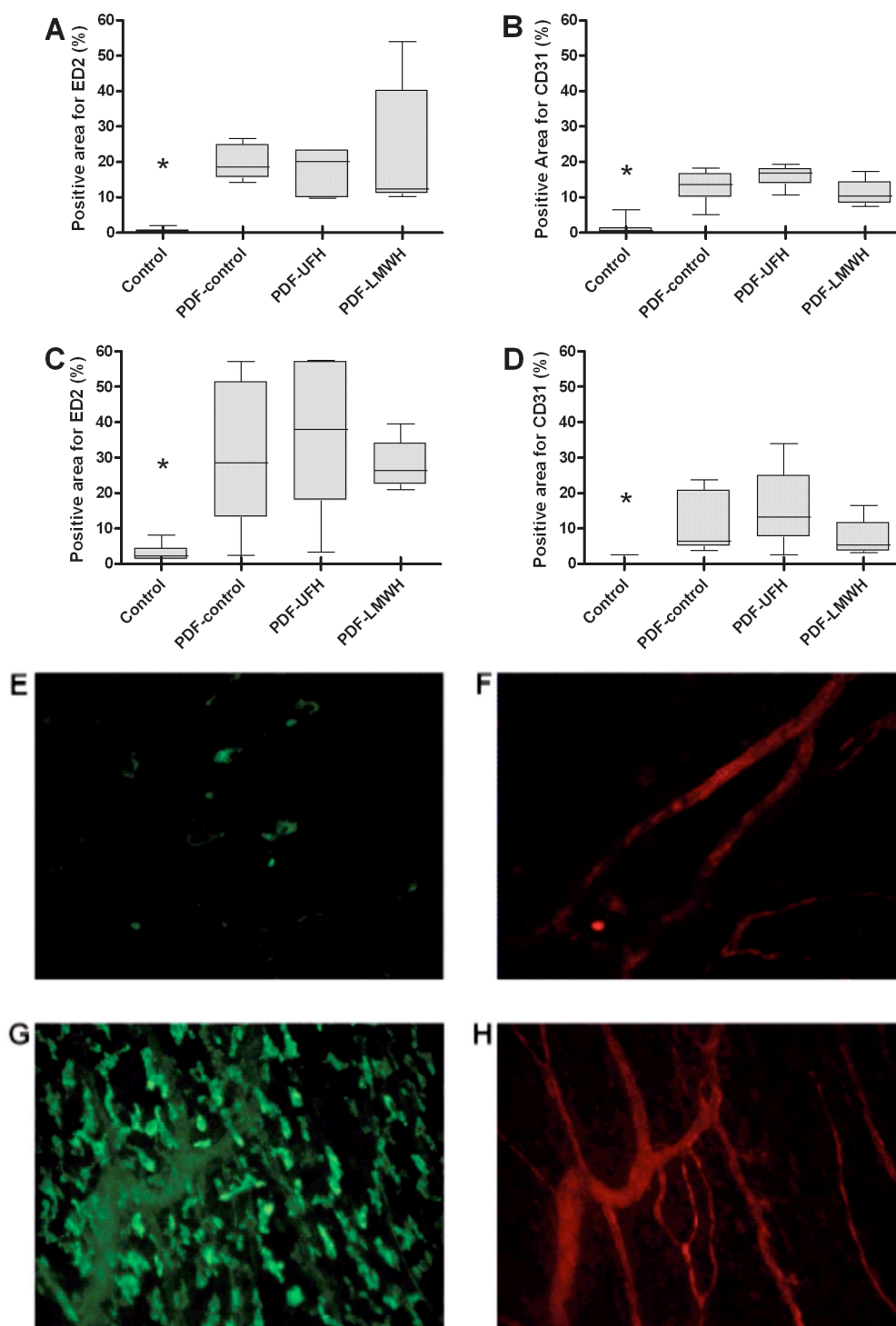


Figure 1 — Macrophage and blood vessel density in mesentery and omentum. Percentage of area positive for macrophages (ED2) (A and C) and vessels (CD31) (B and D) in mesentery (A and B) and omentum (C and D). *Control versus PDF-control: $p < 0.01$. Representative examples of immunophenotyping for ED2 and CD31 of the mesentery (photograph of ED2 and CD31 taken in the same picture frame): ED2 staining of control animal (E) and PDF-control animal (G); CD31 staining of control animal (F) and PDF-control animal (H). PDF = peritoneal dialysis fluid; UFH = unfractionated heparin, added to PDF; LMWH = low molecular weight heparin, added to PDF.

thickness of extracellular matrix to be $8.4 \pm 4.1 \mu\text{m}$. Thickness was significantly increased ($p < 0.01$) in the peritoneum of animals of the PDF-control ($14.7 \pm$

$5.2 \mu\text{m}$), PDF-UFH ($12.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$), and PDF-LMWH ($12.8 \pm 6.3 \mu\text{m}$) groups [Figure 2(a)]. No differences were found between the PDF-treated groups. Sections of the

peritoneum were also stained for CD31 and ED2. Similar to the morphological changes found in the mesentery and the omentum, significantly more macrophages and blood vessels were seen in the PDF-treated animals compared to the control group, with no differences between the three PDF-treated groups [Figures 2(b) to 2(g)]. Correlation analysis showed again a significant positive relation between increased macrophage accumulation and blood vessel density ($r = 0.76$, $p < 0.01$). Positive correlations were also found between matrix thickness and CD31 ($r = 0.78$, $p < 0.01$) and between matrix thickness and ED2 ($r = 0.76$, $p < 0.01$).

Liver Imprints: Mesothelial cell density was measured as a marker for mesothelial cell regeneration. The number of mesothelial cells on the liver showed a significant twofold increase (up to 2045 ± 1167 cells/mm²) in the PDF-control group compared to the untreated animals (1168 ± 273 cells/mm², $p < 0.01$) [Figures 3(a) and 3(b)]. Neither of the two heparins was able to influence mesothelial cell regeneration. Spindle-shaped cells were found between mesothelial cells in PDF-treated animals [Figure 3(b)]. An average of 7% – 10% of the cells found on the liver imprints of PDF-treated animals showed this phenotype, whereas these cells

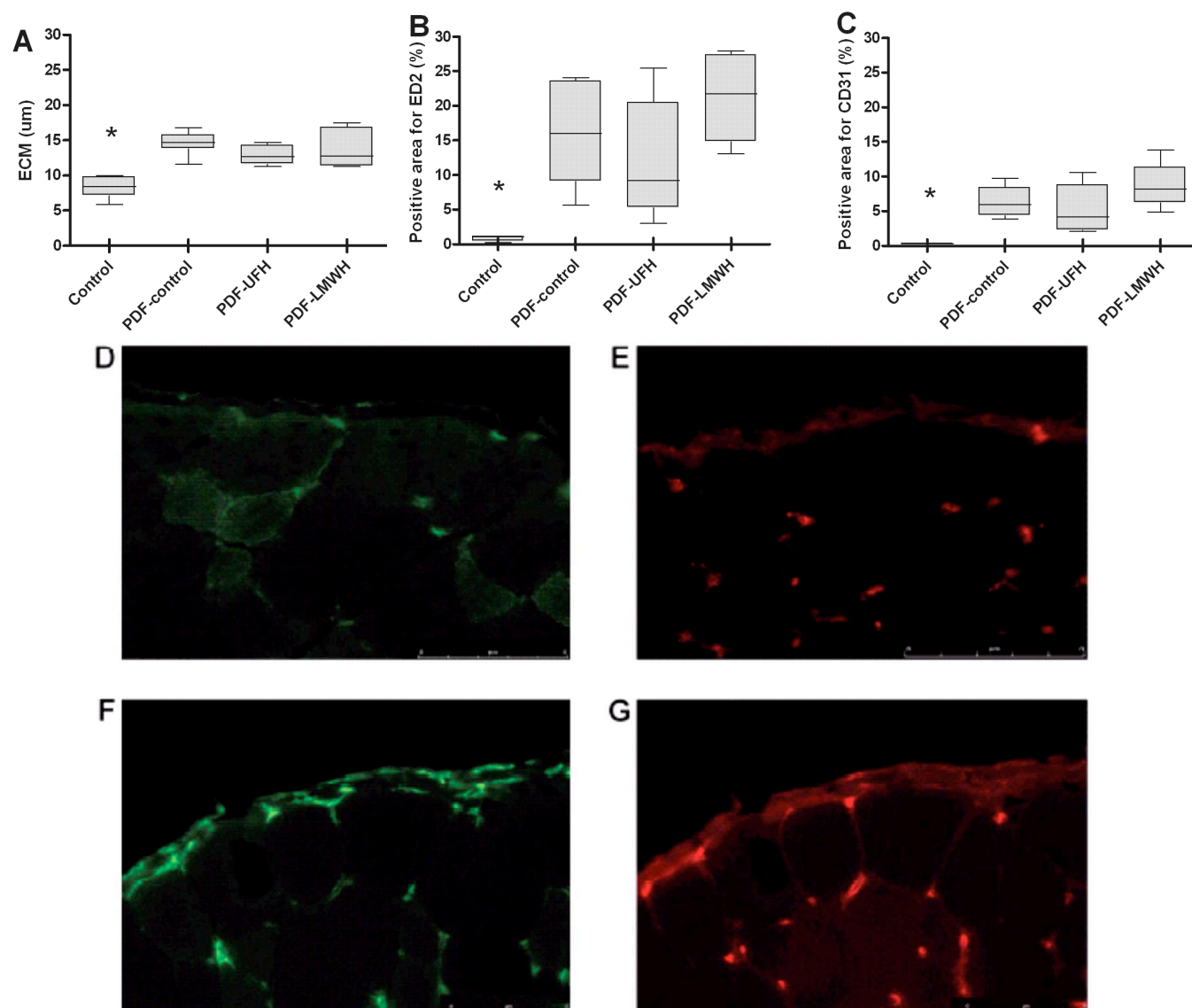


Figure 2 — Morphology of parietal peritoneum. Ultrastructural measurements of the thickness of the abdominal submesothelial extracellular matrix (ECM) (A). Percentage of submesothelial layer positive for ED2 (B) and CD31 (C) in parietal peritoneum. *Control versus PDF-control: $p < 0.01$. Representative examples of immunophenotyping for ED2 and CD31 of the parietal peritoneum (photograph of ED2 and CD31 taken in the same picture frame): ED2 staining of control animal (D) and PDF-control animal (F); CD31 staining of control animal (E) and PDF-control animal (G). PDF = peritoneal dialysis fluid; UFH = unfractionated heparin, added to PDF; LMWH = low molecular weight heparin, added to PDF.

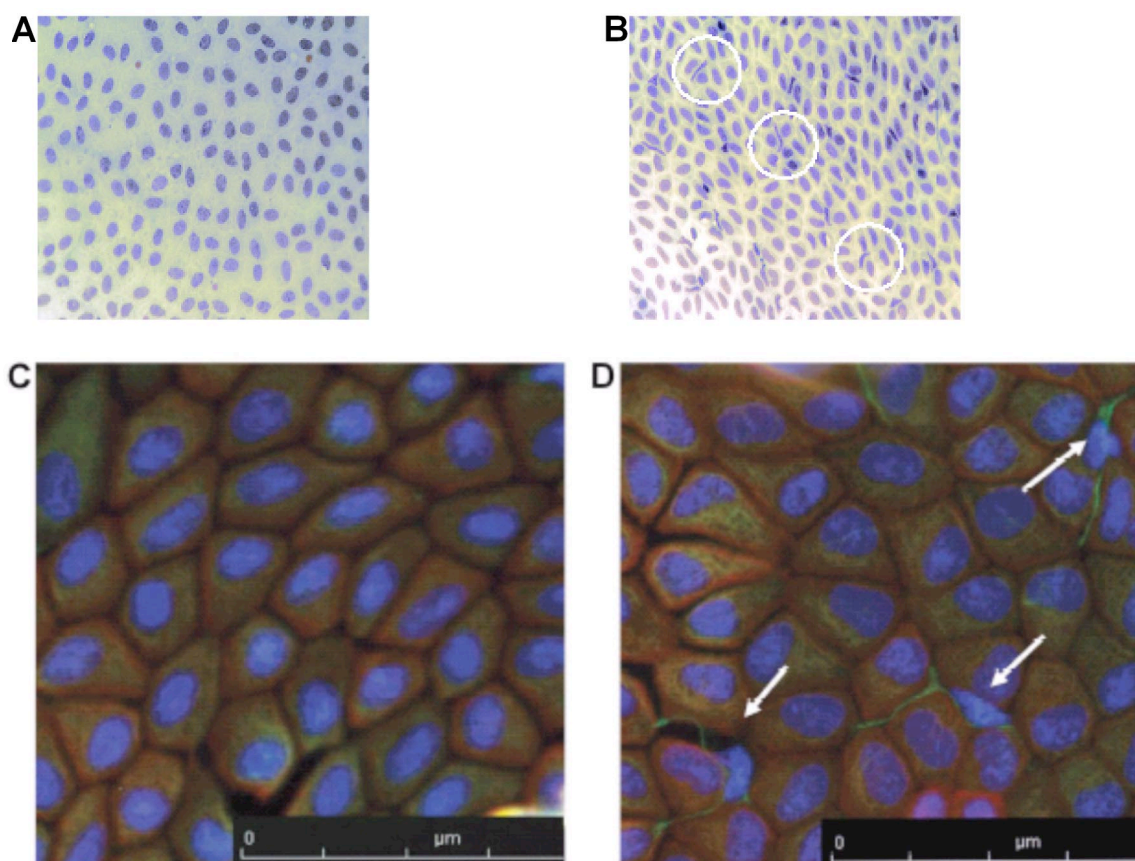


Figure 3 — Morphology of the liver imprints. Representative example of mesothelial imprints of a control (A) and a PDF-treated (B) animal. Spindle-shaped cells (indicated by circles) are present between mesothelial cells on liver imprints of PDF-treated animals (B). Representative example of vimentin (green) and cytokeratin (red) staining of a liver imprint of a control (C) and a PDF-treated animal (D); nuclei are stained in blue. Arrows indicate spindle-shaped cells. PDF = peritoneal dialysis fluid.

were not found in control animals ($p < 0.01$). No differences in the numbers of spindle-shaped cell were found between the three PDF-exposed groups. Vimentin-positive and cytokeratin-negative staining [Figures 3(c) and 3(d)] identified those cells as fibroblast-like cells, indicating either that the imprint picked up submesothelial fibroblasts due to partial injury and denudation of mesothelial cells, or possibly mesothelial cells undergoing EMT [Figure 3(d)].

DISCUSSION

In our study, either UFH or LMWH was added to conventional PDF, based on the characteristics of heparins to reduce new vessel formation and block leukocyte rolling and adhesion, and their ability to bind cytokines and growth factors (6). We showed significant worsening in peritoneal performance after 5 weeks of PDF exposure, as evidenced by high transport characteristics, inflammation, and peritoneal tissue remodeling. Moreover, mesothelial imprints revealed fibroblast-like cells upon PDF exposure. However, none of these PDF-induced

events were diminished or prevented by the addition of UFH or LMWH to the PDF.

We decided to add heparins to the PDF in order to obtain maximal local availability and to minimize systemic effects of the heparin intervention. Nonsignificant changes in APTT clotting times and anti-factor Xa levels indicated that the animals were not over-heparinized during the experiment, whereas increased plasma factor Xa levels after LMWH administration showed that adequate working doses were administered. The concentrations used for UFH and LMWH were clinically relevant doses and were similar or even higher compared to the literature (15,24,27–29). Higher concentrations of heparin might have led to bleeding complications or heparin-induced thrombocytopenia (30). The normal clotting times in animals that received daily heparin might be due in part to the fact that intraperitoneal heparin barely reached the circulation or that it already left the circulation within 3 hours after administration. In line with our results are the unaffected APTT and anti-factor Xa measurements of PD patients that received an intraperitoneal injection of LMWH (14,31,32), whereas in-

creased plasma factor Xa levels were seen after subcutaneous injection (32). These data indicate that intraperitoneal administration of heparin has only minor and partial systemic effects (31,32).

Although our intention to avoid systemic effects of heparin treatment was successful, none of the PDF-induced peritoneal changes could be (partly) prevented by the local heparin treatment. Since we were especially interested in the long-term effects of heparin treatment and wanted to avoid direct effects of heparin, we treated the animals daily during 5 weeks and performed the PETs without heparin 1 day after the last heparin administration. An identical methodological approach has been successfully applied in the past with intraperitoneal aminoguanidine treatment (21). This is an important difference with some other studies and might explain why others reported beneficial effects of glycosaminoglycans, such as heparin or hyaluronan, present in PDF during the PET procedure (15,33), which is explained by a reduction of the peritoneal fluid reabsorption rate due to the formation of a filter-cake of the glycosaminoglycan chains at the tissue-cavity interface.

The fact that chronic treatment with either of the heparins did not prevent peritoneal membrane remodeling (new vessel formation, fibrosis, macrophage influx, and mesothelial EMT) might explain why the peritoneal transport values in the heparin-treated groups were not different from the PDF-control group, since molecular transport is highly dependent on vascular surface area and the thickness and composition of the submesothelial matrix (34). Positive effects of heparin on peritoneal transport are reported in studies by Pawlaczyk *et al.* (13) and Sjoland *et al.* (14). However, the first study showed only marginal and nonsignificant differences with heparin after 30 days of treatment and, to the best of our knowledge, the second study has not been confirmed by others.

The absence of any effect of chronic heparin treatment on peritoneal inflammatory markers such as cell influx might be explained by the fact that intraperitoneal cell recruitment occurs at the level of postcapillary venules (22) and via the omentum (23). We show that microvascular density in the peritoneal tissues was unchanged by heparin treatment. Moreover, the absence of heparin in the circulation during the PET allowed normal selectin-ligand interaction, which is the first step in leukocyte-endothelial interaction. There have been reports of anti-inflammatory properties of heparinoids in other peritoneal inflammatory models. However, in all those studies, the heparinoids were given intravenously and were present in systemic circulation, thereby inhibiting L- and/or P-selectin-dependent peritoneal cell

influx (8,35–38). In line with our results, heparin showed no effects on PDF-induced neutrophil numbers (15), nor did it show any effect on inflammatory cells, fibrosis, or angiogenesis in an animal model of abdominal wound healing (29).

Concerning the role of heparins in angiogenesis, opposite results have been described (29,39). In general, tumor angiogenesis seems to be highly dependent on fibrin formation and tissue factor pathway, processes that are highly modulated by heparin (40). However, not all forms of new vessel formation are fibrin- and/or tissue factor-dependent. An impressive number of factors and mediators might be involved, depending on the model system used (41). The fact that chronic heparin treatment did not prevent neoangiogenesis suggests that intraperitoneal fibrin formation is not involved in our experimental PD model.

Another intriguing finding was the appearance of vimentin-positive cytokeratin-negative spindle-shaped cells within the mesothelial monolayer, which suggests EMT of the mesothelial cells. An alternative explanation would be that the spindle-shaped cells might be submesothelial fibroblasts picked up by the imprint and indicative of partial injury and denudation of mesothelial cells. Addition of either of the heparins did not modify this process and neither heparin affected mesothelial regeneration, as evidenced by increased mesothelial cell density on the liver imprints.

In conclusion, we have confirmed that PD induces significant damage to peritoneal tissues within 5 weeks. Moreover, we have shown an induction of spindle-shaped cells in the mesothelium, indicating either mesothelial damage or EMT. We also conclude that, based on our findings, addition of UFH or LMWH to PDF does not prevent these changes. Therefore, our data do not support long-term peritoneal administration of heparin during chronic PD treatment.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Dutch Kidney Foundation grant #C05-2142.

REFERENCES

1. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, *et al.* Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:470–9.
2. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55:341–56.
3. Davies SJ, Phillips L, Naish PF, Russell GI. Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport

- with time on peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1046–51.
4. Oh KH, Margetts PJ. Cytokines and growth factors involved in peritoneal fibrosis of peritoneal dialysis patients. *Int J Artif Organs* 2005; 28:129–34.
5. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403–13.
6. Casu B, Lindahl U. Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 2001; 57:159–206.
7. Tangelder GJ, Arfors KE. Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood* 1991; 77:1565–71.
8. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993; 82: 3253–8.
9. Xie X, Thorlacius H, Raud J, Hedqvist P, Lindbom L. Inhibitory effect of locally administered heparin on leukocyte rolling and chemoattractant-induced firm adhesion in rat mesenteric venules *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1997; 122:906–10.
10. Bounameaux H. Unfractionated versus low-molecular-weight heparin in the treatment of venous thromboembolism. *Vasc Med* 1998; 3:41–6.
11. Sandercock P, Counsell C, Stobbs SL. Low-molecular-weight heparins or heparinoids versus standard unfractionated heparin for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (2):CD000119.
12. De Vriese AS, Mortier S, Cornelissen M, Palmans E, Vanacker NJ, Leyssens A, *et al.* The effects of heparin administration in an animal model of chronic peritoneal dialysate exposure. *Perit Dial Int* 2002; 22:566–72.
13. Pawlaczyk K, Kuzlan-Pawlaczyk M, Anderstam B, Heimburger O, Bergstrom J, Waniewski J, *et al.* Effects of intraperitoneal heparin on peritoneal transport in a chronic animal model of peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:669–71.
14. Sjoland JA, Smith PR, Jespersen J, Gram J. Intraperitoneal heparin reduces peritoneal permeability and increases ultrafiltration in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1264–8.
15. Bazargani F, Albrektsson A, Yahyapour N, Braide M. Low molecular weight heparin improves peritoneal ultrafiltration and blocks complement and coagulation. *Perit Dial Int* 2005; 25:394–404.
16. Ponce SP, Barata JD, Santos JR. Interference of heparin with peritoneal solute transport. *Nephron* 1985; 39:47–9.
17. Beelen RH, Hekking LH, Zareie M, van den Born J. Rat models in peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:672–4.
18. Hekking LH, Zareie M, Driesprong BA, Faict D, Welten AG, de Greeuw I, *et al.* Better preservation of peritoneal morphologic features and defense in rats after long-term exposure to a bicarbonate/lactate-buffered solution. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2775–86.
19. Hekking LHP, Aalders MC, Van Gelderop E, Zweers MM, Struijk DG, Havenith CE, *et al.* Effect of peritoneal dialysis fluid measured *in vivo* in a rat-model of continuous peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 1998; 14:14–18.
20. Zareie M, De Vriese AS, Hekking LH, ter Wee PM, Schalkwijk CG, Driesprong BA, *et al.* Immunopathological changes in a uraemic rat model for peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:1350–61.
21. Zareie M, Tangelder GJ, ter Wee PM, Hekking LH, van Lambalgen AA, Keuning ED, *et al.* Beneficial effects of aminoguanidine on peritoneal microcirculation and tissue remodelling in a rat model of PD. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:2783–92.
22. Zareie M, van Lambalgen AA, ter Wee PM, Hekking LH, Keuning ED, Schadee-Eestermans IL, *et al.* Better preservation of the peritoneum in rats exposed to amino acid-based peritoneal dialysis fluid. *Perit Dial Int* 2005; 25: 58–67.
23. Zareie M, Fabbri P, Hekking LH, Keuning ED, ter Wee PM, Beelen RH, *et al.* Novel role for mast cells in omental tissue remodeling and cell recruitment in experimental peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:3447–57.
24. Daskalopoulos ME, Daskalopoulou SS, Tzortzis E, Sfiridis P, Nikolaou A, Dimitroulis D, *et al.* Long-term treatment of deep venous thrombosis with a low molecular weight heparin (tinzaparin): a prospective randomized trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 29:638–50.
25. Fosang AJ, Hey NJ, Carney SL, Hardingham TE. An ELISA plate-based assay for hyaluronan using biotinylated proteoglycan G1 domain (HA-binding region). *Matrix* 1990; 10:306–13.
26. Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN. The mesothelium; techniques for investigating the origin, nature and behaviour of mesothelial cells. *J Pathol* 1980; 132:263–71.
27. Norrby K. 2.5 kDa and 5.0 kDa heparin fragments specifically inhibit microvessel sprouting and network formation in VEGF165-mediated mammalian angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2000; 81:191–8.
28. Gunerhan Y, Koksall N, Gul O, Uzun MA, Gunes P, Adaleti R. Effects of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin on colonic anastomoses in the presence of experimental peritonitis. *Eur Surg Res* 2006; 38:353–7.
29. Arikan S, Adas G, Barut G, Toklu AS, Kocakusak A, Uzun H, *et al.* An evaluation of low molecular weight heparin and hyperbaric oxygen treatment in the prevention of intra-abdominal adhesions and wound healing. *Am J Surg* 2005; 189:155–60.
30. Kaplan GG, Manns B, McLaughlin K. Heparin induced thrombocytopenia secondary to intraperitoneal heparin exposure. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:2561–2.
31. Demirkan F, Akarsu M, Sifil A, Tutucu KN. Effect of intraperitoneal administration of low-molecular-weight heparin on plasma tissue factor pathway inhibitor levels in CAPD patients. *Nephron* 2002; 91:162–3.

32. Sifil A, Mermut C, Yenicerioglu Y, Cavdar C, Gumustekin M, Celik A, *et al.* Intraperitoneal and subcutaneous pharmacokinetics of low molecular weight heparin in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2003; 19:28–30.
33. Rosengren BI, Carlsson O, Rippe B. Hyaluronan and peritoneal ultrafiltration: a test of the “filter-cake” hypothesis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37:1277–85.
34. Rippe B, Venturoli D. Simulations of osmotic ultrafiltration failure in CAPD using a serial three-pore membrane/fiber matrix model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1035–F1043.
35. Wan JG, Mu JS, Zhu HS, Geng JG. N-desulfated non-anticoagulant heparin inhibits leukocyte adhesion and transmigration *in vitro* and attenuates acute peritonitis and ischemia and reperfusion injury *in vivo*. *Inflamm Res* 2002; 51:435–43.
36. Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD. Heparin’s anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J Clin Invest* 2002; 110:127–36.
37. Gao Y, Li N, Fei R, Chen Z, Zheng S, Zeng X. P-Selectin-mediated acute inflammation can be blocked by chemically modified heparin, RO-heparin. *Mol Cells* 2005; 19: 350–5.
38. Borsig L, Wang L, Cavalcante MC, Cardilo-Reis L, Ferreira PL, Mourao PA, *et al.* Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J Biol Chem* 2007; 282:14984–91.
39. Norrby K. Low-molecular-weight heparins and angiogenesis. *APMIS* 2006; 114:79–102.
40. Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30:31–44.
41. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem* 2007; 102:840–7.

SHORT REPORTS

Chronic Exposure of Mouse Peritoneum to Peritoneal Dialysis Fluid: Structural and Functional Alterations of the Peritoneal Membrane

An alternative to hemodialysis, peritoneal dialysis (PD) is a form of renal replacement therapy based on the use of the peritoneum as a semipermeable membrane across which ultrafiltration and diffusion take place (1). Permanent exposure to bioincompatible PD fluids (PDFs) and episodes of infections cause inflammation and injury to the peritoneal membrane (PM), which progressively undergoes fibrosis and angiogenesis, and ultimately its dialytic capacity fails (1). The pathophysiologic mechanisms involved in PM deterioration are still poorly understood. However, it is known that myofibroblasts play important roles in inflammatory response, extracellular matrix accumulation, and angiogenesis (2,3). Animal models have added important insight into understanding the pathogenesis of membrane failure. The rat model is the most commonly employed to study fibrosis (4), fluid biocompatibility (5,6), and inflammation (7), but it has not improved our knowledge of mechanisms involved in peritoneal damage. The utilization of genetically manipulated mice creates the possibility of better dissection of the mechanisms involved in PD-induced peritoneal damage and ultrafiltration failure (8). The aim of the present work is the development of a mouse model of chronic PM exposure to PDF instilled through a catheter. The results demonstrate that daily exposure of mouse peritoneum to PDF induces morphological and functional alterations of the PM similar to those observed in PD patients, demonstrating that this model is suitable to study the mechanisms involved in PDF-induced peritoneal damage.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Animals, Surgery, and Exposure to PDF: This study was performed in nonuremic female C57BL/6 mice ($n = 35$, age 12 – 14 weeks; Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). The dropout percentage in our two experimental groups was 30%; dropout was due

mainly to catheter displacement, trapping, and hemo-peritoneum. The mice were housed under standard conditions and with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Review Committee of the Unidad de Cirugía Experimental of Hospital La Paz, Madrid. During the experiment, the health of the mice was checked daily by a veterinary doctor. The mice were weighed every week and those presenting more than 10% weight loss, any sign of port infection, or abnormal activity were excluded from the experiment. Following sacrifice, peritoneum was carefully examined for any sign of bleeding or infection.

Catheter and Installation: A customized vascular access port (ROP; Access Technologies, Skokie, IL, USA) was implanted into the mice. The catheters had 10 holes located within 1 cm of the tip to help the fluid exit and to prevent obstructions [Figure 1(a)]. The animals were anaesthetized with intraperitoneal 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine. Afterwards, we performed an incision in the skin in the right flank of the animal. The skin was separated from the muscle layer below. Through another incision in this second layer, we introduced the end of the catheter into the peritoneal cavity [Figure 1(b)]. The port was displaced at the subcutaneous space of the mouse's back [Figure 1(c)].

During the first week post surgery, 0.2 mL saline was instilled in order to prevent catheter trapping. Thereafter, during the experimental procedure, 1.5 mL standard PDF (lactate with 4.25% glucose; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) or physiologic saline solution was instilled daily for 5 weeks. This volume was chosen because it is almost equivalent to a single exchange in PD patients, relative to body weight, and does not affect mouse respiration. A third group, age matched and not manipulated, was used as control. On the last day of the study, in order to perform the functional analysis of the PM, we instilled PDF (1.5 mL) into the saline- and lactate-instilled groups. After 90 minutes, the mice were anesthetized by isoflurane inhalation and sacrificed by cervical dislocation. Total peritoneal fluid was collected and weighed on a precision balance to calculate drained volume. Peritoneal ultrafiltration capacity was determined by the percentage of peritoneal liquid recovered after 90 minutes.

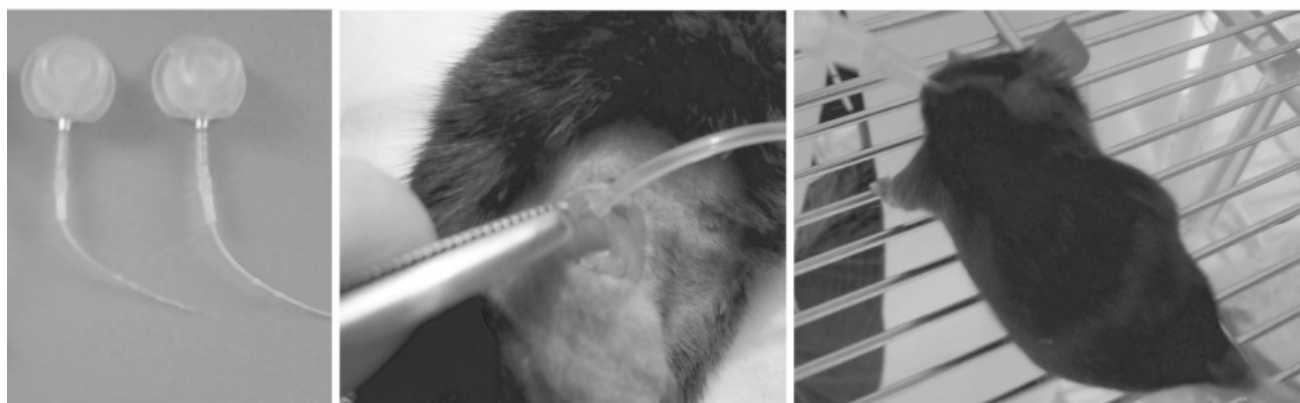


Figure 1 — Catheter installation and peritoneal dialysis fluid instillation in mice. The catheter contains 10 holes located within 1 cm of the tip to help the fluid exit and to prevent obstructions (A). The catheter installation surgical procedure consists of a small incision in the right flank, where the catheter is sutured (B). At the end of the procedure, the catheter port is located in the back of the mouse in the subcutaneous space (C).

Histological Analyses: Tissue collected from parietal and visceral peritoneum was fixed in neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 5- μ m sections. The sections were stained with hematoxylin & eosin and analyzed microscopically (Leica CTR6000, with a Leica Microsystems LAS-AF6000; Witzlar, Germany) to determine the thickness of the mesothelial layer. To determine the presence of blood vessels we stained the sections with anti-CD31 mAb (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) by immunohistochemistry. The thickness of the PM and the number of blood vessels were achieved as the median of seven measurements in different fields of each animal sample.

Statistical Analysis: Statistical analysis of data was performed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Comparison among groups was made with Mann–Whitney test. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Compared to non-manipulated mice, chronic instillation of PDF and saline induced thickening and inflammation of the submesothelial compact zone [Figure 2(a)]. The thickening of PM was due mainly to matrix collagen deposition and increased numbers of cells [Figure 2(c)]. Measurement of the submesothelial fibrotic stroma revealed that the PDF-instilled group had significantly increased peritoneal thickness compared with the saline-instilled group ($p < 0.01$) [Figure 2(c)]. This demonstrates that instillation of peritoneal liquid induces morphological alterations in PM, as happens in patients submitted to PD. In mice, we observed a strong thickening of the mesothelial membrane in a relatively short period, probably because of the high metabolism of these

animals. No significant increase in thickness was observed in PM surrounding the intestines (data not shown). In addition to morphological changes, instillation of PDF also induced functional alterations in peritoneum. Chronic instillation of PDF induced alteration of membrane permeability since the quantity of PDF drained on the last day of the experiment was lower than that in mice chronically instilled with saline [Figure 2(d)]. Immunohistochemistry with anti-CD31 antibodies [Figure 2(b)] revealed that chronically instilled-PDF mice had a higher number of blood vessels at the submesothelial space than the saline-instilled mice [Figure 2(e)]. This strongly suggests that alterations in peritoneal permeability are dependent on angiogenesis at the submesothelial space. Again, this observation is in agreement with observations in patients submitted to PD, where the increase in the numbers of blood vessels plays an important role in PM transport rate and ultrafiltration failure (9).

The results presented here indicate that PM of mice chronically exposed to PDF suffers alterations similar to those observed in patients, and that this mouse model is suitable for the study of mechanisms involved in peritoneal deterioration. The use of an indwelling catheter for chronic instillation of PDF makes our model similar to PD in patient treatment and reduces the risk of infections and hemoperitoneum in chronic treatment. The surgery and catheter did not significantly affect the structure and function of PM. We observed that contact of the catheter with PM produced only localized inflammation and fibrosis, which did not affect peritoneal function. In order to prevent interference by catheter-induced damage in the analyses, we avoided taking samples from areas near the catheter.

This model provides a valuable tool to unravel the molecular basis of PM deterioration through the utiliza-

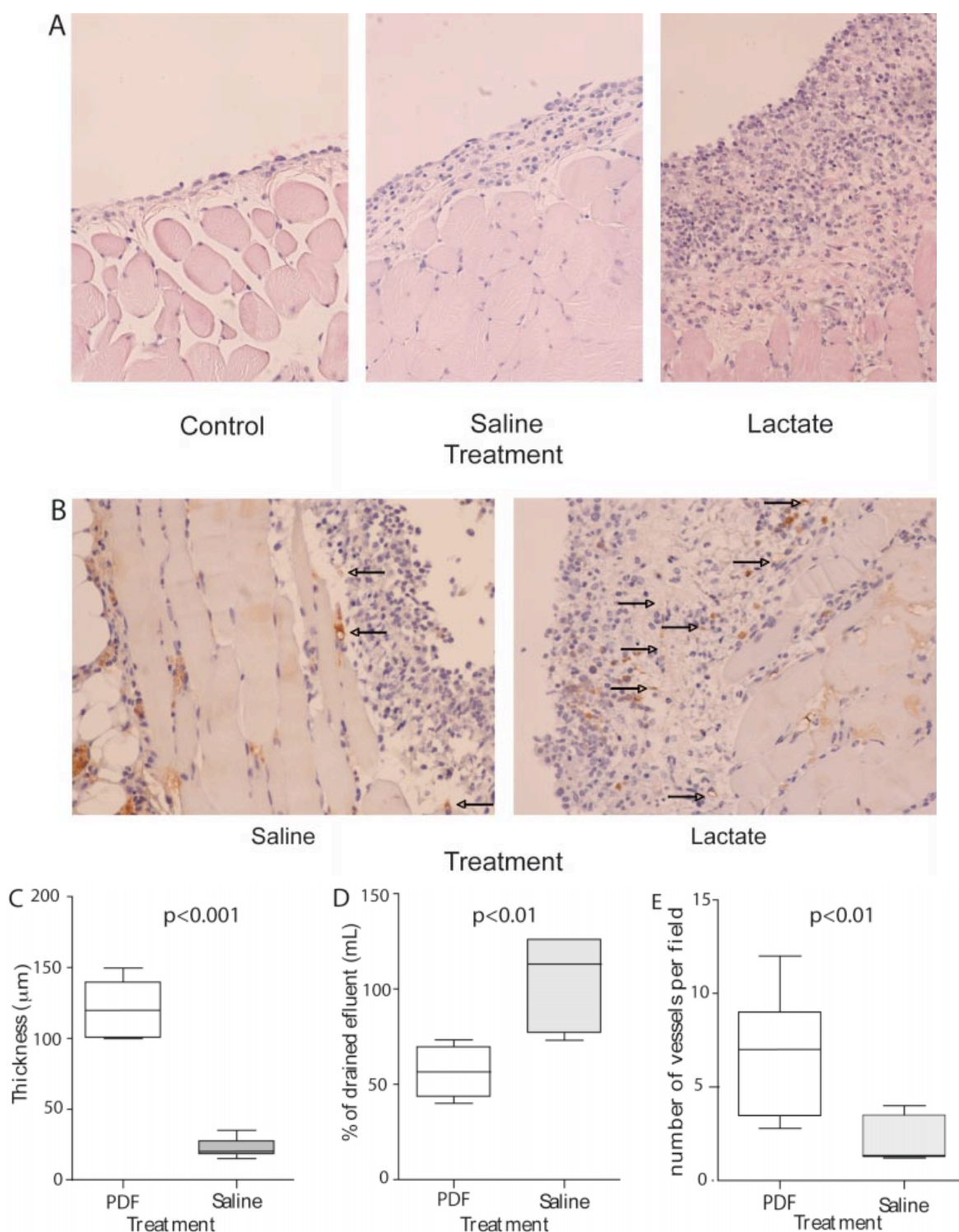


Figure 2 — Exposure to peritoneal dialysis fluid (PDF) induces morphological and functional alterations in the peritoneal membrane. After 5 weeks of fluid instillation, peritoneal biopsies were collected and stained with hematoxylin & eosin. Representative microphotographs of the control (no liquid instillation), saline-instilled, and PDF-instilled groups are shown (A). The staining of CD31-positive blood vessels of both experimental groups are also shown (B). Arrows indicate CD31-positive blood vessels. Structural measurements of the thickness of the submesothelial space reveal that PDF instillation induces thickening of the submesothelial space (C) ($n = 14$ for PDF-instilled and $n = 7$ for saline-instilled mice). Peritoneal function was determined as the percentage of peritoneal effluent recovered 90 minutes after instillation (D) ($n = 8$ for PDF-instilled and $n = 5$ for saline-instilled mice). The numbers of vessels per field of submesothelium were determined in biopsy stained with anti-CD31 (E) ($n = 14$ for PDF-instilled and $n = 7$ for saline-instilled mice).

tion of genetically manipulated mice, and will open the possibility of developing and establishing efficient new therapies.

DISCLOSURE

The authors declare that no financial conflict of interest exists.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2007-61201 (Ministerio de Educación y Ciencia) to M. López-Cabrera, FIS PI 06/0098 and RETICS 06/0016 to R. Selgas, and FIS PI050618 to M.A. Bajo. G.T. González-Mateo received financial support from Gambro Europe.

We thank Javier B. de la Víbora (DVM) and Carlota L. Aramburu (DVM, PhD) for their assistance with the care of the mice.

Guadalupe T. González-Mateo¹

Jesús Loureiro²

José A. Jiménez-Heffernan³

M.-Auxiliadora Bajo¹

Rafael Selgas¹

Manuel López-Cabrera^{2,4a}

Luiz S. Aroeira^{1a*}

Unidad de Investigación y Servicio de Nefrología¹

Hospital Universitario de la Paz

Unidad de Biología Molecular²

Hospital Universitario de la Princesa

Hospital Universitario Puerta de Hierro³

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa⁴

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Red Española de Investigación Renal (REDinREN)

del Instituto de Salud Carlos III, RETICS 06/0016

Madrid, Spain

*e-mail: lstark.hlpr@salud.madrid.org

REFERENCES

1. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55:341-56.
2. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403-13.
3. Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, *et al.* Immunohistochemical char-

acterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444:247-56.

4. Wiecezowska K, Khanna R, Moore HL, Nolph KD, Twardowski ZJ. Rat model of peritoneal fibrosis: preliminary observations. *Adv Perit Dial* 1995; 11:48-51.
5. Hekking LH, Zareie M, Driesprong BA, Faict D, Welten AG, de Greeuw I, *et al.* Better preservation of peritoneal morphologic features and defense in rats after long-term exposure to a bicarbonate/lactate-buffered solution. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2775-86.
6. Zareie M, Hekking LH, Welten AG, Driesprong BA, Schadee-Eestermans IL, Faict D, *et al.* Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury *in vivo*. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:2629-37.
7. Mortier S, Lameire NH, De Vriese AS. The effects of peritoneal dialysis solutions on peritoneal host defense. *Perit Dial Int* 2004; 24:123-38.
8. Nishino T, Ni J, Devuyt O. Transgenic mouse models. *Perit Dial Int* 2007; 27:625-33.
9. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, *et al.* Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:470-9.

Evolution of Gram-Negative Bacilli Susceptibility in Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis in Brazil: a Single Center's Experience Over Nine Years

In recent years, the prevalence of coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* as etiologies of peritoneal dialysis-related peritonitis has progressively diminished (1,2). Possibly, advances in connectology and the widespread use of mupirocin have contributed to this condition (1). In contrast, the prevalence of gram-negatives has not decreased despite medical and technological advances (1,2). In fact, some authors have reported that gram-negatives are the most frequent etiologic agents of peritoneal infections (3,4).

Gram-negative peritonitis, particularly those due to *Pseudomonas aeruginosa*, in general evolve with persistent infection and a high method failure rate (3,5,6). Because of the current high proportion of these cases and the gradual increase in bacterial resistance to several antibiotics (7), the choice of therapeutic regimen is an important challenge for nephrologists. According to the 2005 ISPD guidelines (8), local evaluation of bacterial resistance plays a crucial role in the choice of antibiotic for empirical treatment of peritonitis.

The purpose of the present study was to describe the evolution of gram-negative antibiotic susceptibility over

^a These two authors contributed equally to this work.

CHARACTERIZATION OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION OF MESOTHELIAL CELLS IN A MOUSE MODEL OF CHRONIC PERITONEAL EXPOSURE TO HIGH GLUCOSE DIALYSATE

Luiz S. Aroeira,¹ Jesús Loureiro,² Guadalupe T. González-Mateo,¹ Vanessa Fernandez-Millara,¹ Gloria del Peso,¹ José Antonio Sánchez-Tomero,³ Marta Ruiz-Ortega,⁴ M. Auxiliadora Bajo,¹ Manuel López-Cabrera,^{2,5} and Rafael Selgas^{1a}

Unidad de Investigación and Servicio de Nefrología,¹ Hospital Universitario La Paz; Unidad de Biología Molecular² and Servicio de Nefrología,³ Hospital Universitario de la Princesa; Laboratory of Renal and Vascular Research,⁴ Fundación Jiménez Díaz; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa,⁵ CSIC-UAM, Cantoblanco, Madrid, Spain

Animal models of peritoneal dialysis fluid (PDF) exposure are key tools in the study of mechanisms involved in alterations of the peritoneal membrane and in the design of therapies. We recently developed a mouse model of chronic peritoneal exposure to high glucose dialysate. Herein, we make a sequential analysis of the effects of glucose-based PDF on mouse peritoneal membrane and on mesothelium. We demonstrate that chronic exposure to PDF induces thickness and fibrosis of the peritoneal membrane in a time-dependent manner. We also show that mesothelial cells progressively detach and lose cytokeratin expression. In addition, we demonstrate that some mesothelial cells invade the submesothelial space, where they appear as cytokeratin- and alpha-smooth muscle actin-positive cells. These findings demonstrate that epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of mesothelial cells takes place in mouse peritoneum exposed to PDF, validating this model for the study of effects of drugs on the EMT process as a therapy for peritoneal deterioration.

Perit Dial Int 2008; 28(S5):S29–S33 www.PDConnect.com

KEY WORDS: Mesothelial cell; epithelial-to-mesenchymal transition; mice model of peritoneal dialysis.

Peritoneal dialysis (PD) has become an established alternative to hemodialysis for the treatment of end-stage renal disease. The peritoneal membrane (PM) is used as a semipermeable membrane to obtain ultrafiltration and diffusion. Prolonged exposure to a solution containing a high concentration of glucose and having a low pH, together with episodes of peritoneal infections and hemoperitoneum, cause PM to deteriorate. Mesothelial cell (MC) denudation, fibrosis, and neovasculariza-

tion are the successive morphological alterations suffered by the PM (1). Such structural alterations are the major cause of ultrafiltration failure and encapsulating peritonitis (1).

We have demonstrated that effluent-derived MCs cultured *ex vivo* show progressive loss of their epithelial phenotype and acquire a fibroblast-like phenotype on extension of PD. In addition, these cells acquire the expression of alpha-smooth muscle actin (α SMA), characteristic of a myofibroblast nature (2). Immunohistochemical analysis of peritoneal biopsies from PD patients demonstrated the presence of mesothelial markers in stromal α SMA-positive myofibroblasts, suggesting that these cells could originate from the local conversion of MCs via epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (3). There is emerging evidence supporting the idea that the EMT of MCs plays an important role in the onset of PM deterioration (1). The production of extracellular matrix components and large amounts of vascular endothelial growth factor by transdifferentiated MCs (4) may induce vasodilation, hyperpermeability, high solute transport, rapid disappearance of glucose osmotic gradient, poor ultrafiltration capacity, and, later on, angiogenesis (5). Upon *in vitro* stimulation with inflammatory cytokines, omentum-derived MCs also suffer functional and morphological alterations similar to those observed *in vivo* (2).

Animal models contribute to our understanding of the mechanisms involved in the response to PD. We recently developed a mouse model of PD in which exposure to

Correspondence to: R. Selgas, Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, Castellana, 261, 28046, Madrid, Spain.

rselgas.hulp@salud.madrid.org

^a All the authors belong to the Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas.

classic glucose-based peritoneal dialysis fluids (PDF) induced fibrosis and angiogenesis of PM in 5 weeks of treatment (unpublished observation). These morphological alterations were accompanied by ultrafiltration failure of mouse PM. In that work we addressed the effect of chronic exposure to PDF on mouse PM in the context of EMT of MCs. Our data demonstrated that this animal model will provide a valuable tool to unravel the molecular basis of PM deterioration and to study the anti-EMT effects of drugs as therapy for peritoneal deterioration.

MATERIAL AND METHODS

EXPERIMENTAL ANIMALS, SURGERY, AND PDF EXPOSURE

This study was performed in nonuremic C57BL/6 female mice aged 12–14 weeks (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). The mice were housed under standard conditions and with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Review Committee of the Unidad de Cirugía Experimental de Hospital La Paz.

A customized vascular access port (mouse port; Access Technologies, Strategic Applications, Libertyville, Illinois, USA) was implanted in the mice. Catheters containing ten holes were located within 1 cm from the tip to help the fluid exit and to prevent obstructions. Animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Afterward, the end of catheter was introduced into the peritoneal cavity by the right flank of the animal and the port was displaced at the subcutaneous space of the mouse's back. During the first week post surgery, 0.2 mL saline was instilled in order to prevent catheter trapping. Thereafter, during the experimental procedure, 1.5 mL standard PDF with lactate and 4.25% glucose (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) was instilled. A second group, age matched and not manipulated, was used as control.

During the experiment, the health of the mice was checked daily by the veterinarian. Mice were weighed every week and those presenting more than 10% weight loss or any sign of port infection or abnormal activity were excluded from the experiment. Following sacrifice, peritoneum was carefully examined for any sign of bleeding or infection.

ANTIBODIES AND HISTOLOGICAL ANALYSES

For this study we used mouse anti-pan-cytokeratin and mouse anti- α SMA antibodies (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). In order to avoid unspecific staining with secondary antibodies, these antibodies were

previously conjugated with specific Zenon fab (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacture's instructions.

We collected tissue from parietal peritoneum, fixed it in neutral-buffered formalin, and embedded it in paraffin, which we cut into 5- μ m sections. The sections were stained with Masson's trichrome for fibrosis detection and submesothelial layer thickness was determined microscopically (Leica CTR6000 with an LAS-AF6000; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). For the immunofluorescence analysis of MCs, samples were cut into 3- μ m sections and, after treating with xylol to remove the paraffin, samples were heated for 15 minutes. After that, samples were stained with anti-pan-cytokeratin and anti- α SMA Zenon conjugate. Nuclei were stained with DAPI. Micrography was performed using a fluorescence microscope (Leica CTR6000 with an LAS-AF6000).

STATISTICAL ANALYSES

Statistical analysis of data was performed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad, La Jolla, California, USA). Comparison among groups was made using the Mann-Whitney test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

EXPOSURE TO PDF INDUCES PERITONEAL FIBROSIS

We have previously demonstrated that chronic exposure to conventional glucose-based PDF induces fibrosis in mouse PM. In order to better understand the mechanism of peritoneal damage in this model, we analyzed progression of peritoneal thickening against time of peritoneal exposure to dialysis solution.

Thickness of PM increased with time of exposure to dialysis solution [Figure 1(a)]. Quantitative analysis demonstrated that this increment was significant at the second week of treatment [Figure 1(b)].

MESOTHELIAL CELLS ARE DETACHED DURING PDF TREATMENT AND LOSE CYTOKERATIN EXPRESSION

To analyze the effect of dialysis solution exposure on mice MCs, we stained these cells with anti-cytokeratin and myofibroblasts with anti- α SMA antibodies. Before starting dialysis solution instillation, the PM showed a continuous layer of cytokeratin-positive MCs, properly positioned. Two weeks after PDF instillation, the mesothelium showed evidence of MC loss. At day 30, fill cells of PM were positive for cytokeratin. In addition, we ob-

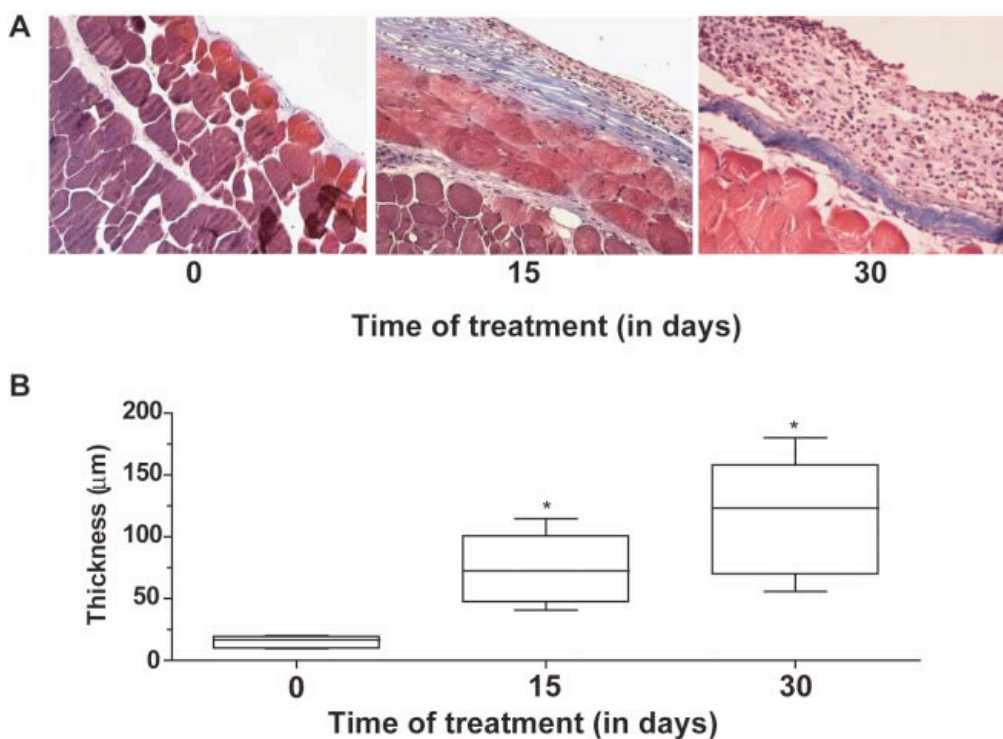


Figure 1 — Chronic exposure to peritoneal dialysis fluid results in increased deposition of extracellular matrix (A) and thickness (B) of the peritoneal membrane in a time-dependent manner. Comparisons between times of observations were performed using the nonparametric Mann–Whitney test. * $p < 0.01$.

served dull cytokeratin-positive cells embedded in the submesothelial compact zone. This suggests that MCs are not only denuding but are also migrating to the submesothelial space (Figure 2).

MESOTHELIAL CELLS UNDERGO EMT IN RESPONSE TO CHRONIC EXPOSURE TO PDF

We have previously described the presence of cytokeratin- and α SMA-positive cells embedded in the

submesothelial space in peritoneal biopsies from PD patients, suggesting that these cells stem from the conversion of MCs into myofibroblasts (3). In order to determine the presence of transdifferentiated MCs in the submesothelial space of mice exposed to dialysis solution, we performed an analysis at high magnification. In the control group, we observed a simple line of MCs expressing cytokeratin. The only α SMA-positive cells were observed in smooth muscle around the blood vessels located deep between muscles (Figure 3, left

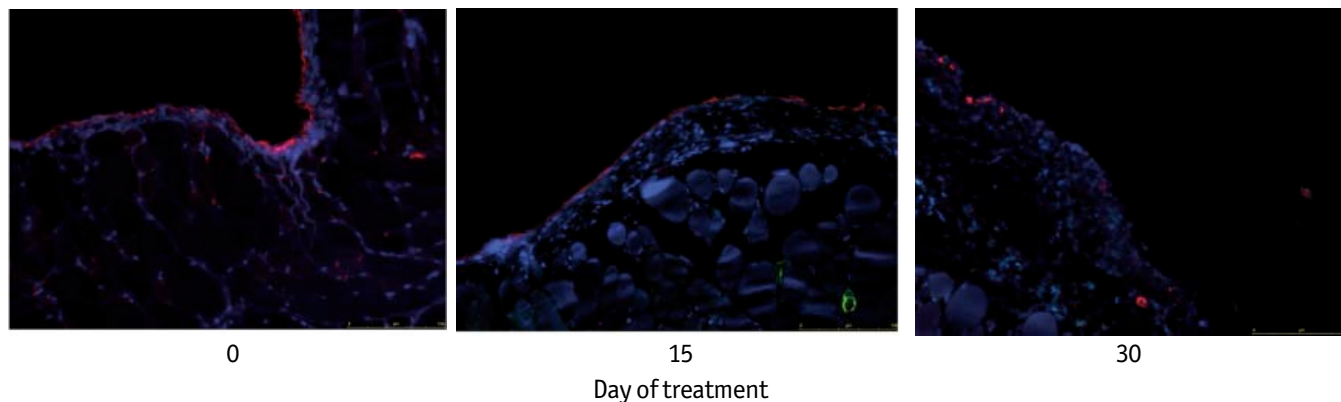


Figure 2 — Immunofluorescence detection of mesothelial cell markers (green: α SMA; red: cytokeratin; blue: DAPI) at different times in a chronic mouse model of peritoneal dialysis fluid exposure demonstrates a time-dependent loss of cytokeratin by mesothelial cells and submesothelial location of mesothelial cells.

panels). In PM of mice exposed to dialysis solution, we observed loss of cytokeratin-positive cells in the mesothelium. The presence of cells expressing both cytokeratin and α SMA in the submesothelial space (Figure 3, white arrows, upper and lower right panels) indicates that at least some of the myofibroblasts involved in peritoneal damage originated from MC conversion in the peritoneum of mice exposed to PDF (Figure 3, right panels).

DISCUSSION

Compromise of PM due to exposure to dialysis solution is a serious event in PD because the treatment is based on the functional integrity of the PM (6). In order to better develop efficient therapies to prevent or treat compromised PM, it is necessary to know the intimate mechanisms involved in its deterioration. The study of human peritoneal biopsies permits only a snapshot of a long and complex process that culminates with peritoneal deterioration. Therefore, the development of ani-

mal models of PD is important in improving knowledge of the mechanisms responsible for peritoneal deterioration and in testing potential counteractions.

We recently described a mouse model of chronic exposure to dialysis fluid in which 5 weeks of treatment caused morphological and functional changes similar to those observed in patients (unpublished observations). Exposure to standard high glucose dialysis solution induced thickening of PM due to the deposition of extracellular matrix. In addition, the treatment also induced angiogenesis that culminated with a lesion similar to that in humans and associated with loss of dialytic capacity of the PM.

One of the important events involved in peritoneal deterioration is myofibroblast conversion of MCs (3). Evidence suggests that these cells play an important role in the deposition of extracellular matrix and the angiogenesis that compromise the PM of PD patients (4). Here, we addressed the effect of chronic exposure to a conventional high glucose dialysis solution on the progression of PM damage. The results demonstrate that

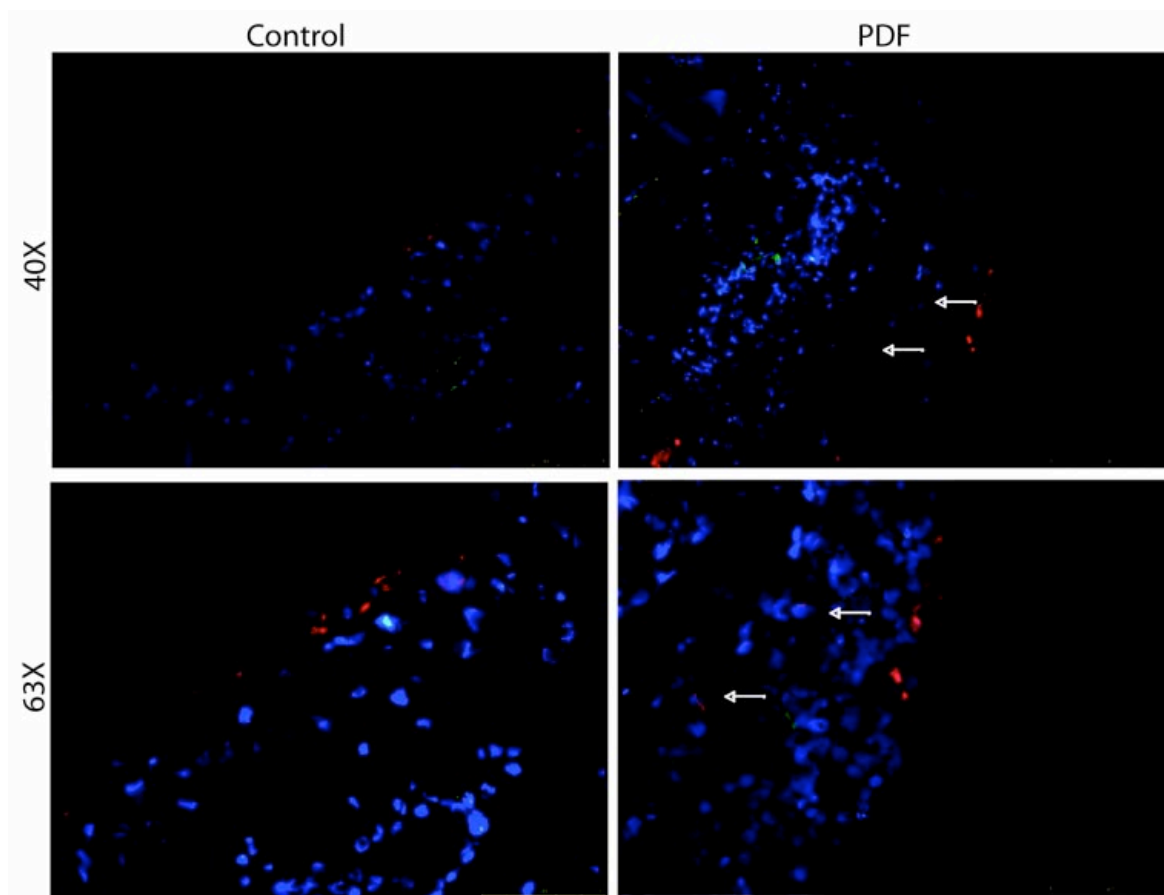


Figure 3 — Mesothelial cells at the submesothelial space express alpha-smooth muscle actin (α SMA). Images of peritoneal biopsies of mice at day 0 (control; left panels) and after 30 days of treatment with peritoneal dialysis fluid (PDF; right panels) were analyzed at $\times 40$ (upper panels) and $\times 63$ (lower panels). The presence of cells expressing both cytokeratin and α SMA at the submesothelial space in PDF-treated mice are shown (white arrows).

peritoneal thickness increases progressively with time of treatment (Figure 1). We also observed that mesothelium denudates while treatment is maintained (Figure 2). In addition, we observed the presence of cytokeratin- and α SMA-positive cells at the submesothelial space, suggesting that EMT of MCs also takes place in our model of chronic exposure to conventional dialysis solution.

The results presented in this work suggest that EMT of MCs also contributes to the progression of peritoneal deterioration in a mouse model. We do not yet know how important this process is in the onset of peritoneal deterioration or the initial mechanisms responsible for MC conversion. However, the mouse model may contribute to answering these questions through the utilization of genetically modified mice.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2007-61201 and PET2006-0256 (from Ministerio de Educación y Ciencia) to M. López-Cabrera and FIS PI06/0098 and RETICS 06/0016 (from Fondo Investigaciones Sanitarias) to R. Selgas. This work was also partially supported by Fresenius Medical Care and Gambro Europe. L.S. Aroeira was supported by RETICS 06/0016. G.T. González-Mateo received financial support from Gambro Europe.

We thank Javier Benito de la Víbora (DVM) and Carlota Largo Aramburu (DVM, PhD) for their assistance with care of the mice.

REFERENCES

1. Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2004–13.
2. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403–13.
3. Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, *et al.* Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444:247–56.
4. Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Cirugeda A, *et al.* Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 938–48.
5. Del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, Bajo MA, Aroeira LS, Aguilera A, Fernandez-Perpen A, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells is an early event during peritoneal dialysis and is associated with high peritoneal transport. *Kidney Int Suppl* 2008; 108:S26–33.
6. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55:341–56.

JASN

Direct targeting of TGF- β 1 preserves peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage



Journal:	<i>Journal of the American Society of Nephrology</i>
Manuscript ID:	JASN-2010-11-1197
Manuscript Type:	Original Article - Basic Research
Date Submitted by the Author:	24-Nov-2010
Complete List of Authors:	Loureiro, Jesús; Hospital Universitario de la Princesa, Unidad de Biología Molecular Aguilera, Abelardo; Hospital Universitario de la Princesa, Nefrología Selgas, Rafael; Hospital Universitario La Paz, Nephrology Sandoval, Pilar; Hospital Universitario de la Princesa, Unidad de Biología Molecular Albar-Vizcaino, Patricia; Hospital Universitario de la Princesa, Unidad de Biología Molecular Perez-Lozano, Maria; Hospital Universitario de la Princesa, Unidad de Biología Molecular Majano, Pedro; Hospital Universitario de la Princesa, Unidad de Biología Molecular Lamas, Santiado; Centro de Biología Molecular-CSIC-UAM, Biología Molecular Rodríguez-Pascual, Fernando; Centro de Biología Molecular-CSIC-UAM, Biología Molecular Borras-Cuesta, Francisco; Universidad de Navarra, Terapia Génica y Hepatología Dotor, Javier; Digna Biotech López-Cabrera, Manuel; Hospital Universitario de la Princesa, Unidad de Biología Molecular
Keywords:	Fibroblasts, fibrosis, Mesothelial to mesenchymal transition, peritoneal dialysis, TGF-beta

SCHOLARONE™
Manuscripts

Title: Direct targeting of TGF-β1 preserves peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage.

Authors: Jesús Loureiro ¹, Abelardo Aguilera ¹, Rafael Selgas ², Pilar Sandoval ¹, Patricia Albar-Vizcaíno ¹, María Luisa Pérez-Lozano ¹, Pedro L. Majano ^{1,3}, Santiago Lamas ⁴, Fernando Rodríguez-Pascual ⁴, Francisco Borrás-Cuesta ⁵, Javier Dotor ⁶, and Manuel López-Cabrera ^{1,3,4,*}.

Affiliations:

¹ Unidad de Biología Molecular and Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain.

² Servicio de Nefrología. Hospital Universitario La Paz, Instituto de Investigación Sanitaria la Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain.

³ CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁴ Centro de Biología Molecular-Severo Ochoa, CSIC-UAM, Cantoblanco, Madrid, Spain.

⁵ Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Area de Terapia Génica y Hepatología. Universidad de Navarra. Pamplona, Spain

⁶ Digna Biotech, Madrid, Spain.

Running title: TGF-β1-blocking peptides and peritoneal damage.

*** Corresponding author:**

Dr. Manuel López-Cabrera.

Unidad de Biología Molecular,

Hospital Universitario de la Princesa,

C/ Diego de León nº 62. 28006-Madrid, Spain.

Phone: 34-91-5202334, Fax: 34-91-5202374.

E-mail: mlopez.hlpr@salud.madrid.org

ABSTRACT

During peritoneal dialysis (PD), mesothelial cells undergo a mesothelial to mesenchymal transition (MMT), and this process is associated with peritoneal membrane dysfunction. Transforming growth factor (TGF)- β 1 is a well-characterized inducer of MMT and has been proposed to be a master molecule in PD fluid-induced peritoneal membrane deterioration. Hence, we evaluated the efficacy of TGF- β 1 blocking peptides in modulating PD fluid-induced MMT and in ameliorating peritoneal damage in a mouse PD model. Exposure of the peritoneum to PD fluid induced fibrosis, angiogenesis, and functional impairment. In addition, PD fluid exposure induced the accumulation in the compact zone of activated fibroblasts expressing “fibroblast specific protein-1” (FSP-1), some of which co-expressed cytokeratin (Cyto⁺/FSP-1⁺), indicating their mesothelial origin. Interestingly, PD fluid treatment triggered the appearance of CD31⁺/FSP-1⁺ and CD45⁺/FSP-1⁺ cells, suggesting that activated fibroblasts also originated from endothelial cells and from bone marrow recruited cells. Administration of blocking peptides significantly ameliorated fibrosis and angiogenesis, improved peritoneal function and reduced the number of FSP-1⁺ cells. The most prominent reduction of FSP-1⁺ fibroblasts was observed in the Cyto⁺/FSP-1⁺ subpopulation, suggesting a major effect of TGF- β 1 on MMT. In this context, over-expression of TGF- β 1 in the peritoneum by adenovirus-mediated gene transfer induced a strong accumulation of activated fibroblasts, most of which deriving from the nearby mesothelium by MMT (Cyto⁺/FSP-1⁺). Accordingly, these results demonstrate that TGF- β 1 has a major role in the peritoneal deterioration induced by dialysis fluids and highlight TGF- β 1-mediated MMT as key process in the patho-physiology of the peritoneal dysfunction.

KEYWORDS: Fibroblasts. Fibrosis. Mesothelial to mesenchymal transition. Peritoneal dialysis. Transforming growth factor- β 1.

INTRODUCTION

Peritoneal dialysis (PD) is an established alternative to hemodialysis for the treatment of end-stage renal disease, and is based on the use of the peritoneum as a semi-permeable membrane across which ultrafiltration and diffusion take place.^{1, 2} The morphology of the peritoneal membrane is simple as it is comprised of a single layer of mesothelial cells that covers a compact zone composed of connective tissue containing a few fibroblasts, mast cells, macrophages and vessels.^{3, 4} One of the most important challenges in PD is the long-term preservation of the peritoneal membrane integrity.⁵ Exposure to non-physiological PD solutions and episodes of infection cause inflammation and damage to the peritoneal membrane, which undergoes a loss of the mesothelial cells monolayer, submesothelial fibrosis, angiogenesis and hyalinizing vasculopathy.⁶⁻⁸ These morphological alterations are associated with increased rates of small-solute transport and with ultrafiltration dysfunction of the peritoneal membrane.^{3, 6-8} The patho-physiological mechanisms underlying the peritoneal membrane failure are still not fully understood. Inflammatory cells and activated fibroblasts, especially myofibroblasts, are considered to be mainly responsible for peritoneal membrane deterioration during long-term PD.^{3, 9, 10} It has been shown that peritoneal myofibroblasts may have at least a dual origin: 1.- From resident fibroblasts through an activation process and 2.- from the mesothelium via mesothelial to mesenchymal transition (MMT).^{11, 12} The MMT is a complex and step-wise process that is characterized by the adoption of a front-back polarity and by the acquisition of increased migratory and invasive capacities, which allow mesothelial cells to invade the submesothelial compact zone.^{3, 13, 14} In addition, mesothelial cells that have undergone a myofibroblast conversion acquire the capacity to synthesize pro-inflammatory and pro-angiogenic factors, as well as extracellular matrix components, thereby contributing to

1
2
3 the deterioration of the peritoneal membrane.¹⁵⁻¹⁸ In this context, it has been shown
4
5 that the presence of mesothelial cells with mesenchymal phenotype, either in the PD
6
7 effluent or peritoneal tissue of PD patients, is correlated with high transport rates.¹⁵⁻¹⁸ In
8
9 other fibrotic disorders, it has been shown that some myofibroblasts may also originate
10
11 from the local conversion of endothelial cells, through an endothelial-to-mesenchymal
12
13 transition (EnMT),¹⁹⁻²¹ and from bone marrow-derived circulating cells (fibrocytes) that
14
15 are recruited to the injured tissues.²²⁻²⁴ The presence of these myofibroblasts
16
17 subpopulations in the damaged peritoneum and their contribution to the fibrotic process
18
19 induced by PD has not been described so far.
20
21
22
23

24 Transforming growth factor (TGF)- β 1 is a strong profibrotic cytokine^{25, 26} and
25
26 is considered a prototypical inducer of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in
27
28 several tissues and organs.^{27, 28} TGF- β 1 is also a key factor for the myofibroblastic
29
30 differentiation of resident fibroblasts and recruited fibrocytes and for the mesenchymal
31
32 conversion of endothelial cells via EnMT.^{20, 24, 29} TGF- β 1 binds to a specific type I
33
34 serine-threonine kinase receptor and triggers different Smad-dependent and Smad-
35
36 independent signalling pathways, which result in a profound molecular reprogramming
37
38 including the down-regulation of the intercellular adhesion molecule E-cadherin and the
39
40 up-regulation of mesenchymal-associated molecules such as snail, fibronectin, collagen
41
42 I and α -smooth muscle actin.^{3, 26, 27}
43
44
45
46
47

48 Among the cytokines and growth factors produced during peritoneal
49
50 inflammatory and repair responses, TGF- β 1 is considered a master molecule in the
51
52 development of peritoneal dysfunction, because its over-expression has been correlated
53
54 with worse PD outcomes.³⁰⁻³² The relevance of TGF- β 1 in peritoneal damage was
55
56 further suggested in experimental animal models, in which TGF- β 1 gene was
57
58 transduced into the peritoneal cavity with adenovirus vectors, recapitulating the
59
60

1
2
3 structural and functional alterations observed in PD patients.³³⁻³⁵ In addition, we and
4
5 other authors have described that intraperitoneal over-expression of molecules
6
7 counteracting TGF- β 1-triggered Smad signalling, including Smad-7 and bone
8
9 morphogenic protein-7, prevented and reversed PD fluid induced peritoneal worsening.
10
11
12
13 ³⁶⁻⁴⁰ Furthermore, it has been shown that inhibition of TGF- β 1-induced Smad-
14
15 independent pathways ameliorates the peritoneal membrane alterations in different
16
17 experimental models.⁴¹ However, the potential protective effects for the peritoneal
18
19 membrane of agents directly targeting TGF- β 1 have not been explored.
20
21

22
23 In this study, we used two synthetic peptides (P17 and P144) designed to
24
25 directly bind TGF- β 1 and to block its biological function, which have demonstrated
26
27 robust anti-fibrotic effects in various organs such as the liver, heart and skin.⁴²⁻⁴⁵ We
28
29 show that intraperitoneal administration of these blocking peptides to mice exposed to
30
31 PD fluid preserved the peritoneal morphology and function and decreased the
32
33 accumulation of different subpopulation of activated (FSP-1⁺) fibroblasts, especially of
34
35 those co-expressing the mesothelial marker cytokeratin. Conversely, we also show that
36
37 over-expression of TGF- β 1 in the peritoneum mostly induced the accumulation of
38
39 activated fibroblasts derived from the mesothelium. These results point to TGF- β 1-
40
41 mediated MMT as a key process in the peritoneal damage induced by PD.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

TGF- β 1-blocking peptides ameliorate PD-induced peritoneal membrane structural and functional alterations.

We analyzed whether the TGF- β 1-blocking peptides P17 and P144 might prevent the deterioration of the peritoneal membrane in a mouse model of PD fluid exposure. Mice were instilled daily with standard lactate-based PD fluid via catheters and intraperitoneally administered control peptide (PDF group) or TGF- β 1-blocking peptides (PDF+P17 and PDF+P144 groups) for five weeks. Animals that were daily instilled with saline solution via catheters served as baselines throughout the whole study (Control group). Histological analysis of parietal peritoneum biopsies showed that PD fluid exposure produced a loss of mesothelial cells monolayer and increased the peritoneal membrane thickness when compared with control group (Figures 1A and 1B). Administration of peptides P17 or P144 to PD fluid-treated mice significantly reduced the peritoneal thickness and preserved the mesothelium (Figures 1A and 1B).

To test the effect of blocking peptides on PD fluid-induced angiogenesis, blood vessels of parietal peritoneum were stained with an anti-CD31 antibody. There was a significant increase in the number of vessels in PD fluid-instilled mice when compared with the control saline-treated mice and administration of peptides P17 or P144 to PD fluid-instilled mice significantly reduced this angiogenesis (Figures 2A and 2B). To further explore the effects of TGF- β 1 blockade on angiogenesis, the effluent levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured in the different experimental conditions. PD fluid exposure strongly increased the concentration of VEGF in the peritoneal cavity, and administration of peptides P17 or P144 significantly reduced the levels of this factor (Figure 2C). Interestingly, a correlation between vessel formation

and the production of VEGF was observed, reinforcing the notion of the relevance of this growth factor in peritoneal angiogenesis (Figure 2D).

To analyze the functional relevance of the observed morphological changes of the peritoneum, a peritoneal ultrafiltration test was performed on the last day of treatments. Mice of the Control, PDF and PDF+P17 and PDF+P144 groups were instilled with 2 mL of PD solution and 30 minutes later the total peritoneal volumes were recovered. As shown in Figure 3A, the volumes recovered from PD fluid-exposed animals were lower than those from saline-treated mice and a significant increase of volumes recovered was obtained in mice exposed to PD fluid that were administrated peptides P17 or P144. We observed that the loss of ultrafiltration correlated with peritoneal thickness (Figure 3B), angiogenesis (Figure 3 C) and with the production of VEGF (Figure 3D). These results demonstrated that the blockade of TGF- β 1 ameliorated the deleterious effects of PD fluid on the peritoneum, reducing fibrosis and angiogenesis and ultimately, improving peritoneal membrane function.

TGF- β 1-blocking peptides reduce the accumulation of activated fibroblasts in response to PD.

Another characteristic histological change of the peritoneal membrane during PD is the accumulation of activated fibroblasts (FSP-1⁺ fibroblasts) in the submesothelial compact zone.^{39, 46} In the peritoneum from control saline-treated mice, there was no expression of FSP-1. By contrast, FSP-1⁺ fibroblasts were present in the submesothelial compact region of mice treated with PD fluid (Figures 4A and 4B). A remarkable finding was the clustering tendency of FSP-1⁺ fibroblasts, mainly restricted to the upper submesothelial area, but in some cases, especially those with prominent fibrosis, FSP-1⁺ fibroblasts also appeared in the deeper compact zone (Figure 4A). PD

fluid-instilled mice treated with peptides P17 or P144 showed significant decreased submesothelial accumulation of activated FSP-1⁺ fibroblasts (Figures 4A and 4B).

TGF- β 1-blocking peptides exert a major effect on PD fluid-induced mesothelial to mesenchymal transition.

To characterize the different subpopulations of activated fibroblasts in the injured peritoneum during PD fluid exposure, two-colour immunofluorescence analysis were performed using the anti-FSP-1 antibody in conjunction with antibodies against cytokeratin (mesothelial marker), CD45 (pan-leukocyte marker expressed by fibrocytes) or CD31 (endothelial marker). As expected, in the peritoneum from control mice the expression of cytokeratin was exclusively restricted to the preserved mesothelium (Suppl. Figure S1) and the expression of CD31 was confined to deeper vessels located in the muscular tissue (Figure 2 and Suppl. Figure S1). Furthermore, in the control peritoneum there was no expression of FSP-1 (Figure 4 and Suppl. Figure S1) and CD45⁺ cells were barely detected (Suppl. Figure S1). In the peritoneal tissue of PD fluid-instilled mice there was clustering accumulation of FSP-1⁺ fibroblasts, and different numbers of these activated fibroblasts co-expressed cytokeratin (Figures 5A and 5B), CD45 (Figures 6A and 6B) or CD31 (Figures 7A and 7B). The most abundant subpopulations, in terms of number per field, were those co-expressing Cyto⁺/FSP-1⁺ and CD45⁺/FSP-1⁺, whereas only a small number of the fibroblasts were CD31⁺/FSP-1⁺ (Figure 8A). The average percentages of the different subpopulations of activated fibroblasts were 37% for Cyto⁺/FSP-1⁺, 34% for CD45⁺/FSP-1⁺ and 5% for CD31⁺/FSP-1⁺ (Figure 8B). The remaining 24% were single positive for FSP-1, being their most probably origin the resident fibroblasts (Figure 8B).

Administration of peptides P17 or P144 to PD fluid-treated mice significantly reduced the number per field of Cyto⁺/FSP-1⁺ (Figures 5A and 5B), CD45⁺/FSP-1⁺ (Figures 6A and 6B) and CD31⁺/FSP-1⁺ (Figure 7A and 7B). Of note, the number of fibroblasts single positive for FSP-1 did not substantially change upon blocking peptides administration, indicating that the activation of resident fibroblasts by PD fluid exposure was not TGF-β1 dependent (Figure 8A and Suppl. Figure S2). Proportionally, the most prominent reduction by the blocking peptides was observed in the Cyto⁺/FSP-1⁺ subpopulation (Figures 8A and 8B), suggesting a major effect of TGF-β1 on the generation of activated fibroblasts through the mesenchymal conversion of mesothelial cells.

Over-expression of TGF-β1 induces the peritoneal accumulation of FSP-1⁺ fibroblasts, most of which co-expressing cytokeratin.

In previous studies, it was shown that TGF-β1 over-expression reproduced the structural and functional alterations of the peritoneum observed in PD patients and that MMT appeared during the early stages (days 4 to 7) of peritoneal damage.³³⁻³⁵ To characterize the different subpopulations of activated fibroblasts in response to TGF-β1 over-expression, adenovirus-mediated gene transfer experiments were carried out. Mice were infected with control adenovirus or adenovirus encoding active TGF-β1 by intraperitoneal injection, and animals were killed on day 4 after infection. Parietal peritoneal sections were subjected to dual staining using anti-FSP-1 antibody in conjunction with antibodies against cytokeratin, CD45 or CD31.

As expected, mice infected with control adenovirus showed normal peritoneal histology with a mesothelial cell monolayer, a thin submesothelial compact zone, and few vessels located in the muscular tissue. Furthermore, the expression of FSP-1 in

these control mice was absent and the expression of CD45 was barely detected (Suppl. Figure S3). In contrast, mice infected with adenovirus harboring TGF- β 1 showed loss of mesothelial cells monolayer, a fibro-proliferative response and a strong accumulation of FSP-1⁺ fibroblasts (Figure 9A). Importantly, the most abundant subpopulation of FSP-1⁺ fibroblasts was that co-expressing Cyto⁺/FSP-1⁺ (Figures 9A and 9B), representing about 64% of the activated fibroblasts (Figure 9C). There was also a relevant accumulation of CD45⁺/FSP-1⁺ cells (Figures 9A and 9B), with an average percentage of 29% (Figure 9C), whereas single positive FSP-1⁺ and CD31⁺/FSP-1⁺ fibroblasts were only marginally represented (Figure 9C). These results further demonstrated that TGF- β 1 exerted a major effect on mesothelial cells, which through the MMT process constituted the main source of activated fibroblasts in the injured peritoneum.

DISCUSSION

During the last few years it has been speculated that the MMT of mesothelial cells might be a potential target for therapeutic intervention to preserve the peritoneal morphology and function.^{3, 9, 10} The presence of mesothelial cells that have undergone an MMT in the effluent and in the peritoneum of PD patients was first demonstrated in a landmark paper published in 2003.¹¹ Since then, there has been emerging evidences that pointed to the mesenchymal conversion of mesothelial cells as an important mechanism of peritoneal structural and functional deterioration.^{12, 15-18} The MMT process can be easily engaged by a wide spectrum of stimuli including cytokines, growth factors, glucose degradation products and advanced glycation end products that are highly present during PD.^{3, 9, 10} It is important to point out that most of these MMT inducers have been identified by using *in vitro* cell culture system in which mesothelial cells were treated with purified factors at high concentrations. These fractionated studies are necessary to define the potential role of each individual factor in regulating MMT, however they do not mimic the real situation *in vivo*, in which the MMT regulators are present at low concentrations. In the complex micro-environment that occurs during PD fluid-induced tissue injury a wide range of cytokines and factors are up-regulated making it difficult to assign priorities or hierarchy for their effects on MMT and on the onset and progression of peritoneal damage.^{3, 10} Nonetheless, TGF-β1 has been proposed to be a key molecule in PD fluid-induced peritoneal membrane deterioration.³⁰⁻⁴¹ However, the direct targeting of TGF-β1 in the context of PD has not been achieved so far.

In the present study, we demonstrate that intraperitoneal administration of two TGF-β1-blocking peptides to mice exposed to PD fluid significantly decreases peritoneal fibrosis and angiogenesis, partially preserves membrane function, and

significantly blocks the accumulation of activated (FSP-1⁺) fibroblasts. We have previously shown that in response to PD the activated fibroblasts may originate from resident fibroblasts and from the mesothelium via MMT.^{11, 12, 39, 46} Herein, we provide evidences for the first time that peritoneal FSP-1⁺ fibroblasts may also derive from bone marrow-derived circulating cells (CD45⁺) and from the local conversion of endothelial cells (CD31⁺) via EnMT. The percentage of mesothelial cells-derived FSP-1⁺ fibroblasts, 37%, in the injured peritoneum is in agreement with that found in renal fibrosis, in which about 36% come from local conversion of tubular epithelial cells via EMT,²² reinforcing the notion that fibrogenesis is, at least to some extent, a local epithelial event. In contrast, the percentages of FSP-1⁺ fibroblasts deriving from circulating CD45⁺ cells and from endothelial cells in the PD fluid exposed peritoneum differ sharply from those observed in fibrotic kidney. Whereas in renal fibrogenesis about 14-15% of pathologic fibroblasts derive from bone marrow CD45⁺ cells^{22, 23} and 30-50% from CD31⁺ endothelial cells,¹⁹ in the injured peritoneum we have estimated percentages of 34% and 5% for the CD45⁺/FSP-1⁺ and CD31⁺/FSP-1⁺ subpopulations, respectively. These divergent observations may suggest that tissue- and organ-specific micro-environments dictate the different proportions of pathologic fibroblasts subpopulations. Furthermore, it might be speculated that the contribution of the different fibroblast subpopulations to the peritoneal structural and functional deterioration is not necessarily dependent on their relative abundance. In this sense, we have observed that the most abundant Cyto⁺/FSP-1⁺ subpopulation correlates with peritoneal fibrosis better than the other subpopulations (Suppl. Figure S4), whereas the less representative CD31⁺/FSP-1⁺ subpopulation shows the strongest correlation with the loss of ultrafiltration (Suppl. Figure S5). The fibroblasts single positive for FSP-1, that represented up to 24% of the whole population, correlate neither with peritoneal

fibrosis nor with the loss of ultrafiltration (Suppl. Figures S4 and S5). It is worthwhile to note that activated fibroblasts, especially myofibroblasts, are commonly observed in peritoneal biopsies from PD patients.^{12, 14} Nevertheless, the heterogeneous origin of these myofibroblasts and their roles in the setting and progression of different features related with peritoneal deterioration (e.g. inflammation, fibrosis, angiogenesis, high small-solute transport and loss of ultrafiltration) have not been explored in depth. In this regards, only few studies have been carried out with PD patients, which have shown significant correlations among high peritoneal transport rates and the presence of MMT-derived fibroblasts either in the effluents or in peritoneal tissue specimens.¹⁵⁻¹⁸ Further studies will be required to determine if other myofibroblast subpopulations, besides those derived from mesothelial cells, may also have pathologic roles in the peritoneal membrane of PD patients.

It has been well documented that TGF- β 1 is a strong inducer of both MMT and EnMT.^{3, 11, 13-16, 20, 21} TGF- β 1 also appears to be a key factor for the myofibroblastic differentiation of resident fibroblasts and recruited fibrocytes.^{23, 24, 29} In this study, we show that administration of two different TGF- β 1-blocking peptides to PD fluid-treated mice significantly reduced the number of activated fibroblasts derived from mesothelium (Cyto⁺/FSP-1⁺), from bone marrow recruited cells (CD45⁺/FSP-1⁺) and from endothelial cells (CD31⁺/FSP-1⁺). By contrast, the number of fibroblasts single positive for FSP-1 do not change after the administration of blocking peptides, suggesting that the activation of resident fibroblasts during PD is achieved in a TGF- β 1-independent manner by other growth factors or cytokines. One important finding is that the most prominent reduction by the blocking peptides is exerted on the Cyto⁺/FSP-1⁺ subpopulation, suggesting that the MMT process is tightly regulated by TGF- β 1 levels in the context of PD fluid exposure. This hypothesis is further reinforced by the

fact that intraperitoneal TGF- β 1 over-expression results in a stronger accumulation of Cyto⁺/FSP-1⁺ fibroblasts than any other subpopulation of activated fibroblasts. Furthermore, *in vitro* cell culture experiments demonstrate that treatment of omentum-derived mesothelial cells with TGF- β 1-blocking peptide prevents the MMT induced by PD effluents from patients with episodes of peritonitis (Suppl. Figure S6).

We are aware that agents directly blocking TGF- β 1 cannot be easily employed in the clinical practice of PD, at least for long-term treatments, because TGF- β 1 has important modulating functions of the immune and inflammatory responses.⁴⁷ This issue is particularly important in patients suffering episodes of peritonitis, in which the inflammation could be exacerbated upon interfering TGF- β 1-mediated signaling. In this context, it has been shown that impaired TGF- β 1 signaling enhances peritoneal inflammation induced by bacterial infection in a rat PD model.⁴⁸ Our results about the beneficial effects of TGF- β 1-blocking peptides provide further evidences about the feasibility of considering the MMT of mesothelial cells as a therapeutic target to ameliorate peritoneal deterioration in PD patients. It can be expected that further molecular studies of the TGF- β 1 signaling pathways involved in the mesenchymal conversion of mesothelial cells, will provide more specific strategies for long-term preservation of peritoneal membrane with minimum side effects.

CONCISE METHODS

Peptides and adenoviral vectors

P17 is a small 15-mer peptide (KRIWFIPRSSWYERA) that was identified to bind TGF-β1 using a phage-displayed peptide library and demonstrated to block the activity of TGF-β1 *in vitro* and *in vivo*.⁴² P144 is a synthetic 14-mer peptide designed from TGF-β1 type III receptor (TSLDASIIWAMMQN), which has been shown to bind TGF-β1 and to inhibit its activity *in vitro* and *in vivo*.^{43, 44} As a control, we used the irrelevant 14-mer peptide SVSRARPRLLLLGL designed from NS5B protein of hepatitis C virus genotype 2a (amino acids 3005-3018). P17, P144, and control peptides were synthesized by the F-moc solid phase method as previously described.⁴² The purity of peptides was at least 95% as judged by HPLC. The adenoviral vector expressing active TGF-β1 was kindly provided by David Dichek, (University of Washington, Seattle) and has been previously described.⁴⁹

Peritoneal dialysis fluid exposure model in mice

A total of 44 female C57BL/6 mice aged between 12 and 16 weeks old were used in this study (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). The experimental protocol used was in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the Animal Ethics Committee of the “Unidad de Cirugía Experimental” of “Hospital Universitario la Paz”. PD fluid or saline solution were instilled via a peritoneal catheter connected to an implanted subcutaneous mini access port (Access Technologies, Skokie, IL, USA) as previously described.^{16, 46, 50} During the first week after surgery, the animals implanted with a peritoneal access port (n= 44) received 0.2 ml of saline with 1 IU/ml heparin to facilitate wound healing. Thereafter, during a 5-week period, eight mice were daily instilled with 1.5 ml of saline solution (control; n= 8), 12 mice were daily instilled with

1.5 ml of standard PD fluid composed of 4.25% glucose and buffered with lactate (Stay Safe; Fresenius, Bad Homburg, Germany) and treated with control peptide (4 mg/g/day; PDF group), 12 mice were daily instilled with 1.5 ml of standard PD fluid and treated with p17 (4 mg/kg/day; PDF+P17 group) and 12 mice were daily instilled with 1.5 ml of standard PD fluid and treated with p144 (4 mg/kg/day; PDF+P144 group). The doses of P17 and P144 employed in this study were similar to those used previously.^{42, 43, 44, 51} Two animals of the PDF group and one in each of the others groups were not used in the final analysis, being the main causes of drop-outs catheter port infection or traumatic catheter removal (Control group, n=7; PDF group, n=10; PDF + P17, n= 11; PDF + P144, n=11). A peritoneal equilibrium test was performed during the last day of treatments. All the mice were instilled with 2 ml of PD solution and 30 min later, animals were anaesthetized with isoflurane (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada) and sacrificed to recover the total peritoneal volumes. Parietal peritoneum samples were obtained from the contralateral side of the implanted catheter. During the experiment, food and water were provided ad libitum to the animals.

Overexpression of TGF- β 1 in the peritoneum by adenovirus-mediated gene transfer

Eight female C57BL/6 mice (12 and 16 weeks old) were used in this experiment (Harlan Interfauna Iberica). The experimental protocol used was in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the Animal Ethics Committee of the “Unidad de Cirugía Experimental” of “Hospital Universitario la Paz”. Mice were injected intraperitoneally with 100 μ L of suspensions containing 1×10^8 pfu of an adenovirus expressing active TGF β 1 (n=5) or 1×10^8 pfu of the empty adenoviral vector that serves as a control (n=3). Food and water were provided ad libitum. Four days after the injection, animals were anesthetized

with isoflurane (MTC Pharmaceuticals) and sacrificed. The parietal peritoneum of all animals was collected for histological and immunofluorescence analysis.

Morphological analysis of peritoneal samples and VEGF measurement

For histological analyses, specimens of the parietal peritoneum were obtained from the contralateral side to the tip of the implanted catheter. Cryostat sections (5 µm) were cut and stained with Masson's trichrome (Merck, Darmstadt, Germany) to quantify fibrosis. The thickness of submesothelial tissue was determined by blinded microscope analysis using a metric ocular, and was expressed as the mean of 10 independent measurements for each animal. Frozen sections were stained for immunofluorescence analysis with antibodies to visualize vasculature (CD31; Serotec, Oxford, UK), mesothelial cells (Pan-Cytokeratin; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), bone marrow-derived cells (CD45; BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA) and activated fibroblasts (FSP1; Dako, Glostrup, Denmark). The frozen sections were fixed for 15 minutes in 4% formaldehyde in PBS, and blocked with 10% horse serum for 60 minutes in PBS with 0.3% Triton X-100. First antibodies were incubated in PBS with 0.1 % Triton X-100 overnight at 4C. After 3 washing steps (5 minutes in PBS with 0.1/ Triton X-100), secondary Alexa-labelled antibodies were incubated during 90 minutes at room temperature. After another washing process, the preparations were mounted with a 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear stain (Vectashield; Vector Laboratories). Negative controls for immunofluorescence staining were conducted using 10% rabbit serum instead of primary antibody. Images were analysed by computerized digital image analysis (AnalySIS, Soft Imaging System). Number of cells with single or double positive staining was counted and was expressed as the mean of 10 independent measurements for each animal. The amounts of VEGF in the peritoneal effluents were

determined by an ELISA-based assay, according to the manufacturer instructions (PeproTech; Rocky Hill, USA).

Statistical analysis

Results are presented as 25th and 75th percentiles, median, minimum, and maximum values in box plots graphics of Figures 1 to 9. The mean \pm SE appears at the top of the box of graphics of Figures 1 to 7. In Figures 8 and 9 the percentages were calculated using the median of each fibroblast subpopulation. The data groups were compared with the non-parametric Mann–Whitney rank sum U-test using the SPSS statistic package version 14.5 (Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism version 4.0 (La Jolla, CA, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2010-21249 and SAF2007-61201 from the “Ministerio de Ciencia e Innovación” to M.L.-C., by grants from “Fondo de Investigaciones Sanitarias” (FIS) PI 09/0641 to R.S., PI 07/00126 to A.A. and from REDinREN (RETICS 06/0016, Fondos FEDER, EU) to R.S. This work was also partially supported by Digna Biotech, Fresenius Medical Care, and Baxter Healthcare Corp (The Baxter Extramural Grant Program 2007). We thank Francisca Molina Jiménez for technical assistance and Javier Benito de la Víbora and Carlota Largo Aramburu for the assistance with mouse care.

DISCLOSURES

Javier Dotor is an employee of Digna Biotech. Francisco Borrás-Cuesta is an adviser of Digna Biotech.

REFERENCES

1. Krediet RT: The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int*, 55: 341-356, 1999
2. Krediet RT, Lindholm B, Rippe B: Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int*, 20 (Suppl 4): S22-S42, 2000
- 3.- Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jiménez Heffernan JA, Selgas R, Lopez-Cabrera M: Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol*, 18: 2004-13, 2007.
4. Yung S, Chan TM: Intrinsic cells: mesothelial cells - central players in regulating inflammation and resolution. *Perit Dial Int*, 29 (Suppl 2): S21-S27, 2009
5. Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, Borrego F, Jimenez C, Del Peso G, De Alvaro F: Functional longevity of the human peritoneum: how long is continuous peritoneal dialysis possible?. Results of a prospective medium long-term study. *Am J Kidney Dis*, 23: 64-73, 1994.
6. Williams, JD, Craig, KJ, Topley, N, Von Ruhland, C, Fallon, M, Newman, GR, Mackenzie, RK, Williams, GT: Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 13:470-9, 2002.
7. Mateijsen MA, van der Wal AC, Hendriks PM, Zweers MM, Mulder J, Struijk DG, Krediet RT: Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int*, 19:517-525, 1999
8. Plum J, Hermann S, Fusshöller A, Schoenicke G, Donner A, Röhrborn A, Grabensee B: Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int Suppl*, 78: S42-S47, 2001
9. Margetts PJ, Bonniaud P: Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int*, 23: 530-541, 2003
10. Devuyst O, Margetts PJ, Topley N: The pathophysiology of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol*, 21: 1077-1085, 2010
11. Yáñez-Mo, M, Lara-Pezzi, E, Selgas, R, Ramírez-Huesca, M, Domínguez-Jiménez, C, Jiménez-Heffernan, JA, Aguilera, A, Sánchez-Tomero, JA, Bajo, MA, Alvarez, V, Castro, MA, del Peso, G, Cirujeda, A, Gamallo, C, Sánchez-Madrid, F, López-

- Cabrera, M: Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*, 348:403-13, 2003.
12. Jiménez-Heffernan, JA, Aguilera, A, Aroeira, LS, Lara-Pezzi, E, Bajo, MA, del Peso, G, Ramírez, M, Gamallo, C, Sanchez-Tomero, JA, Alvarez, V, López-Cabrera, M, Selgas, R: Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch*, 444:247-56, 2004
13. Yang, AH, Chen, JY, Lin, JK: Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int*, 63:1530-9, 2003.
14. Aguilera A, Yáñez-Mo M, Selgas R, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M: Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs* 6: 262-268, 2005
15. Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, Cirugeda A, Bajo MA, del Peso G, Sánchez-Tomero JA, Jiménez-Heffernan JA, López-Cabrera M: Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis*, 46: 938-948, 2005
16. Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Loureiro J, Aguilera A, Ramírez-Huesca M, González-Mateo G, Pérez-Lozano ML, Albar-Vizcaíno P, Bajo MA, del Peso G, Sánchez-Tomero JA, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, López-Cabrera M: Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol*, 20: 582-592, 2009
17. Del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Aroeira LS, Aguilera A, Fernández-Perpén A, Cirugeda A, Castro MJ, de Gracia R, Sánchez-Villanueva R, Sánchez-Tomero JA, López-Cabrera M, Selgas R: Epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells is an early event during peritoneal dialysis and is associated with high peritoneal transport. *Kidney Int Suppl*, 108: S26-S33, 2008
18. Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, Nishimura H, Suzuki Y, Hattori R, Matsukawa Y, Imai M, Oliver N, Goldschmeding R, Aten J, Krediet RT, Yuzawa Y, Matsuo S: Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298: F721-733, 2010

19. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R: Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*, 19: 2282-2287, 2008
20. Li J, Qu X, Bertram JF: Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol*, 175:1380-1388, 2009
21. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R: Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*, 13: 952-961, 2007
22. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG: Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 110: 341-350, 2002
23. Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, Kaneko S: Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 14098-14103, 2006
24. Bellini A, Mattoli S: The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest*, 87: 858-870, 2007
25. Border WA, Noble NA: Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med*, 331: 1286-1292, 1994
26. Shi Y, Massagué J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685-700, 2003
27. Xu J, Lamouille S, Derynck R: TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 19:156-172, 2009
28. López-Novoa JM, Nieto MA: Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med*, 1: 303-314, 2009
29. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G: Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblast. *J Cell Biol*, 122: 103-111, 1993
30. Lai KN, Lai KB, Lam CW, Chan TM, Li FK, Leung JC: Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*, 35: 644-652, 2000

31. Gangji AS, Brimble KS, Margetts PJ: Association between markers of inflammation, fibrosis and hypervolemia in peritoneal dialysis patients. *Blood Purif*, 28: 354-8, 2009
32. Yao Q, Pawlaczyk K, Ayala ER, Styszynski A, Breborowicz A, Heimbürger O, Qian JQ, Stenvinkel P, Lindholm B, Axelsson J: The role of the TGF/Smad signaling pathway in peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis solutions. *Nephron Exp Nephrol*, 109: e71-78, 2008
33. Margetts PJ, Kolb, M, Galt, T, Hoff, CM, Shockley, TR Gaultie, J: Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol*, 12: 2029-2039, 2001
34. Margetts PJ, Bonniaud, P, Liu, L, Hoff, CM, Holmes, CJ, West-Mays, JA Kelly, MM: Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol*, 16: 425-436, 2005
35. Patel P, Sekiguchi Y, Oh KH, Patterson SE, Kolb MR, Margetts PJ: Smad3-dependent and -independent pathways are involved in peritoneal membrane injury. *Kidney Int*, 77: 319-328, 2010
36. Guo H, Leung JC, Lam MF, Chan LY, Tsang AW, Lan HY, Lai KN: Smad7 transgene attenuates peritoneal fibrosis in uremic rats treated with peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol*, 18: 2689-2703, 2007
37. Nie J, Dou X, Hao W, Wang X, Peng W, Jia Z, Chen W, Li X, Luo N, Lan HY, Yu XQ: Smad7 gene transfer inhibits peritoneal fibrosis. *Kidney Int*, 72: 1336-1344, 2007
38. Sun Y, Zhu F, Yu X, Nie J, Huang F, Li X, Luo N, Lan HY, Wang Y: Treatment of established peritoneal fibrosis by gene transfer of Smad7 in a rat model of peritoneal dialysis. *Am J Nephrol*, 30: 84-94, 2009
39. Loureiro J, Schilte M, Aguilera A, Albar-Vizcaíno P, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, González-Mateo G, Aroeira LS, Selgas R, Mendoza L, Ortiz A, Ruíz-Ortega M, van den Born J, Beelen RH, López-Cabrera M: BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. *Nephrol Dial Transplant*, 25:1098-1108, 2010
40. Yu MA, Shin KS, Kim JH, Kim YI, Chung SS, Park SH, Kim YL, Kang DH: HGF and BMP-7 ameliorate high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelium. *J Am Soc Nephrol*, 20: 567-581, 2009

41. Zhu F, Li T, Qiu F, Fan J, Zhou Q, Ding X, Nie J, Yu X: Preventive effect of Notch signaling inhibition by a gamma-secretase inhibitor on peritoneal dialysis fluid-induced peritoneal fibrosis in rats. *Am J Pathol*, 176: 650-659, 2010
42. Dotor J, López-Vázquez AB, Lasarte JJ, Sarobe P, García-Granero M, Riezu-Boj JI, Martínez A, Feijó E, López-Sagaseta J, Hermida J, Prieto J, Borrás-Cuesta F: Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine*, 39: 106-115, 2007
43. Ezquerro IJ, Lasarte JJ, Dotor J, Castilla-Cortázar I, Bustos M, Peñuelas I, Blanco G, Rodríguez C, Lechuga Mdel C, Greenwel P, Rojkind M, Prieto J, Borrás-Cuesta F: A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine*, 22: 12-20, 2003
44. Hermida N, López B, González A, Dotor J, Lasarte JJ, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, Díez J: A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 81: 601-609, 2009
45. Santiago B, Gutierrez-Cañas I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Pablos JL: Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol*. 125: 450-455, 2005
46. Sandoval P, Loureiro J, González-Mateo G, Pérez-Lozano ML, Maldonado-Rodríguez A, Sánchez-Tomero JA, Mendoza L, Santamaría B, Ortiz A, Ruíz-Ortega M, Selgas R, Martín P, Sánchez-Madrid F, Aguilera A, López-Cabrera M: PPAR- γ agonist rosiglitazone protects peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage. *Lab Invest*, 90: 1517-1532. 2010
47. Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T: Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem*, 147: 781-792, 2010
48. Wang X, Nie J, Jia Z, Feng M, Zheng Z, Chen W, Li X, Peng W, Zhang S, Sun L, Mao H, Lan HY, Yu X: Impaired TGF-beta signalling enhances peritoneal inflammation induced by E. coli in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 25: 399-412, 2010
49. Otsuka G, Agah R, Frutkin AD, Wight TN, Dichek DA. Transforming growth factor beta 1 induces neointima formation through plasminogen activator inhibitor-1-dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26:737-743, 2006

50. González-Mateo GT, Loureiro J, Jiménez-Hefferman JA, Bajo MA, Selgas R, López-Cabrera M, Aroeira LS: Chronic exposure of mouse peritoneum to peritoneal dialysis fluid: structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *Perit Dial Int*, 29: 227-230, 2009

51. Gil-Guerrero L, Dotor J, Huibregtse IL, Casares N, López-Vázquez AB, Rudilla F, Riezu-Boj JI, López-Sagaseta J, Hermida J, Van Deventer S, Bezunartea J, Llopiz D, Sarobe P, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ: In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1. *J Immunol*, 181: 126-135, 2008

For Peer Review

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Administration of TGF- β 1-bocking peptides P17 or P144 decreases PD-induced peritoneal membrane thickness in a mouse model. Mice received a daily instillation of standard PD fluid for 5 weeks and i.p. administrated with control peptide (4mg/kg/day: PDF, n=10), P17 (4mg/kg/day: PDF + P17, n=11), or P144 (4mg/kg/day: PDF + P144, n=11). A control group of mice that were instilled with saline was also included (Control; n=7). Peritoneal samples were prepared and analyzed as described in the Materials and Methods. **(A)** Standard PD fluid exposure increases matrix deposition and the thickness of the peritoneal membrane, while TGF- β 1-bocking peptides administration significantly reduces these effects when measured in Masson's trichrome stained sections (representative slides). **(B)** Box Plots graphic represent 25th and 75th percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols represent the statistic differences between groups. Magnification X200.

Figure 2. Treatments with TGF- β 1-bocking peptides P17 or P144 decrease PD-induced angiogenesis and inhibit VEGF production. Mice received a daily instillation of standard PD fluid for 5 weeks and i.p. administrated with control peptide (PDF, n=10), P17 (PDF + P17, n=11), or P144 (PDF + P144, n=11). A control group of mice that were instilled with saline was also included (Control; n=7). **(A)** Standard PD fluid exposure increases peritoneal angiogenesis and TGF- β 1-bocking peptides administration significantly reduces the number of vessels, as determined by CD31 staining (representative slides). **(B)** Box plots represent the median, minimum and maximum values, as well as the 25th and 75th percentiles. Numbers above boxes depict mean \pm SE of CD31⁺ staining. Symbols represent the statistical differences between

groups. Magnification x200. (C) Analysis of VEGF in the drained volumes shows a strong increase of this growth factor in PD fluid-instilled animals, and administration of TGF- β 1-bocking peptides significantly reduces VEGF production. Box plots are depicted as picograms per millilitre and represent the median, minimum and maximum values, as well as the 25th and 75th percentiles. Numbers above boxes depict mean \pm SE of VEGF levels. Symbols represent the statistical differences between groups. (D) Correlation between angiogenesis (CD31⁺ staining) and VEGF levels (pg/mL) in the whole group of mice (Spearman regression, $p < 0.0001$; $n = 39$).

Figure 3.- TGF- β 1-bocking peptides P17 or P144 treatments improve peritoneal ultrafiltration. A 30 minutes ultrafiltration test was performed on the last day of treatments. (A) The volumes recovered from animals exposed to PD fluid (PDF; $n=10$) are lower than those from mice instilled with saline solution (Control; $n=7$), and a increase of net ultrafiltration is obtained in mice exposed to PD fluid that were administrated P17 (PDF+P17; $n=11$) or P144 (PDF+P144; $n=11$). Box Plots graphic represent 25th and 75th percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols represent the statistic differences between groups. (B to D) Correlations between ultrafiltration and peritoneal thickness (μ m), angiogenesis (CD31⁺ staining), and VEGF levels (pg/mL) in the whole group of mice (Spearman regression, $n = 39$)

Figure 4. TGF- β 1-bocking peptides reduce the number of activated fibroblasts in the compact zone of parietal peritoneum. (A) Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal tissue sections stained for FSP-1 (red) with DAPI counterstaining shows accumulation of activated fibroblasts in the submesothelial space

in the PDF group (n=10), and the administration of P17 or P144 peptides reduces the number of FSP-1 positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). The expression of FSP-1 is absent in animals instilled with saline (Control, n=7). Representative pictures are presented. Magnification X 200. **(B)** The reductions of the number of FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols show statistical differences between groups.

Figure 5. Effects of TGF- β 1-blocking peptides on the number of activated fibroblasts derived from mesothelial cells. **(A)** Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal sections stained for cytokeratin (green) and FSP-1 (red) with DAPI counterstaining show accumulation of trans-differentiated mesothelial cells in the submesothelial space (cytokeratin positive cells) in the PDF group (n=10), some of which co-express FSP-1 (yellow cells in the Merge panel). The administration of P17 or P144 peptides reduces the number of cytokeratin/FSP-1 double positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Representative slides are presented. Magnification X 200. **(B)** The reductions of the number of cytokeratin/FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols show statistical differences between groups.

Figure 6. Effects of TGF- β 1-blocking peptides on the number of activated fibroblasts derived from bone marrow-recruited cells. **(A)** Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal biopsies stained for CD45 (green) and FSP-1 (red) with DAPI counterstaining show the recruitment of circulating leukocytes in the

PDF group (n=10), some of which co-express FSP-1 (yellow cells in the Merge panel). The administration of P17 or P144 peptides reduces the number of CD45/FSP-1 double positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Representative pictures are presented. Magnification X 200. **(B)** The reductions of the number of CD45/FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols show statistical differences between groups.

Figure 7. Effects of TGF- β 1-bocking peptides on the number of activated fibroblasts derived from endothelial cells. (A) Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal samples stained for CD31 (green) and FSP-1 (red) with DAPI counterstaining show the appearance of CD31/FSP-1 double positive cells in the PDF group (n=10). The administration of P17 or P144 peptides reduces the number of CD31/FSP-1 double positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Representative pictures are presented. Magnification X 200. **(B)** The reductions of the number of CD31/FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols show statistical differences between groups.

Figure 8. Relative effects of TGF- β 1-bocking peptides on the different subpopulations of activated fibroblasts. (A) Box Plot graphics represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum of the numbers of activated fibroblasts from different origin in the PDF, PDF + P17, and PDF + P144 groups. **(B)**

Circles depict the average percentages of the different subpopulations of activated fibroblasts in the PDF, PDF + P17, and PDF + P144 groups.

Figure 9. Over-expression of TGF- β 1 in the peritoneum induces the accumulation of activated fibroblasts, most of which deriving from mesothelial cells. Mice were infected with adenovirus encoding active TGF- β 1 by intraperitoneal injection, and animals were killed on day 4 after infection. **(A)** Parietal peritoneal sections were subjected to dual Immunofluorescence analysis using anti-FSP-1 antibody (red) in conjunction with antibodies against cytokeratin, CD45 or CD31 (green). A strong accumulation of cytokeratin/FSP-1 double positive fibroblasts is observed (yellow cells in the Merge panel). Representative slides are presented. Magnification X 200. **(B)** Box Plot graphics represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum of the numbers of activated fibroblasts from different subpopulations. **(C)** Circle depicts the average percentages of the different subpopulations of activated fibroblasts.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure S1. Dual immunofluorescence staining of peritoneal tissues from saline-instilled mice. In the peritoneum from control mice the expression of cytokeratin is restricted to the mesothelial cells monolayer and the expression of CD31 is confined to deeper vessels located in the muscular tissue. In these control mice there is no expression of FSP-1 and CD45⁺ cells are barely detected. Representative pictures are presented. Magnification X 200.

Supplementary Figure S2. TGF-β1-blocking peptides do not affect the number of FSP-1 single positive fibroblasts. Box Plot graphics represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum of the numbers of FSP-1⁺ fibroblasts in the PDF, PDF + P17, and PDF + P144 groups.

Supplementary Figure S3. Dual immunofluorescence staining of peritoneal biopsies from mice infected with empty adenoviral vector. The peritoneal tissues from these control mice show expression of cytokeratin only in the mesothelial cells monolayer and the expression of CD31 is confined to deeper vessels. In these control mice there is no expression of FSP-1 and CD45⁺ cells are barely detected. Representative slides are presented. Magnification X 200.

Supplementary Figure S4. Correlations between peritoneal fibrosis and different fibroblasts subpopulations. (A to C) In the whole group of mice instilled with PD fluid, the number of fibroblasts per field of the Cyto⁺/FSP-1⁺, CD45⁺/FSP-1⁺ and CD31⁺/FSP-1⁺ subpopulations correlate with peritoneal thickness (μm). Of note, the

Cyto⁺/FSP-1⁺ subpopulation correlates with peritoneal fibrosis better than the other subpopulation. **(D)** Fibroblasts single positive for FSP-1 do not correlate with peritoneal fibrosis. (Spearman regression, n = 32).

Supplementary Figure S5. Correlations between loss of ultrafiltration and different fibroblasts subpopulations. (A to C) In the whole group of mice instilled with PD fluid, the number of fibroblasts per field of the Cyto⁺/FSP-1⁺, CD45⁺/FSP-1⁺ and CD31⁺/FSP-1⁺ subpopulations correlate with the loss of ultrafiltration. Of note, the CD31⁺/FSP-1⁺ subpopulation correlates with peritoneal fibrosis better than the other subpopulation. **(D)** Fibroblasts single positive for FSP-1 do not correlate with loss of ultrafiltration. (Spearman regression, n = 32).

Supplementary Figure S6. TGF- β 1-blocking peptide P17 interferes with effluent-induced MMT of mesothelial cells. Omentum-derived mesothelial cells were treated with PD effluents from patients with episodes of peritonitis for different time points. **(A and B)** Quantitative RT-PCR shows that peptide P17 blocks the induction of Snail and prevents E-cadherin down-regulation. **(C and D)** P17 blocks the up-regulation of the MMT-associated molecules collagen I and fibronectin. Bars depict mean \pm SE of three independent experiments.

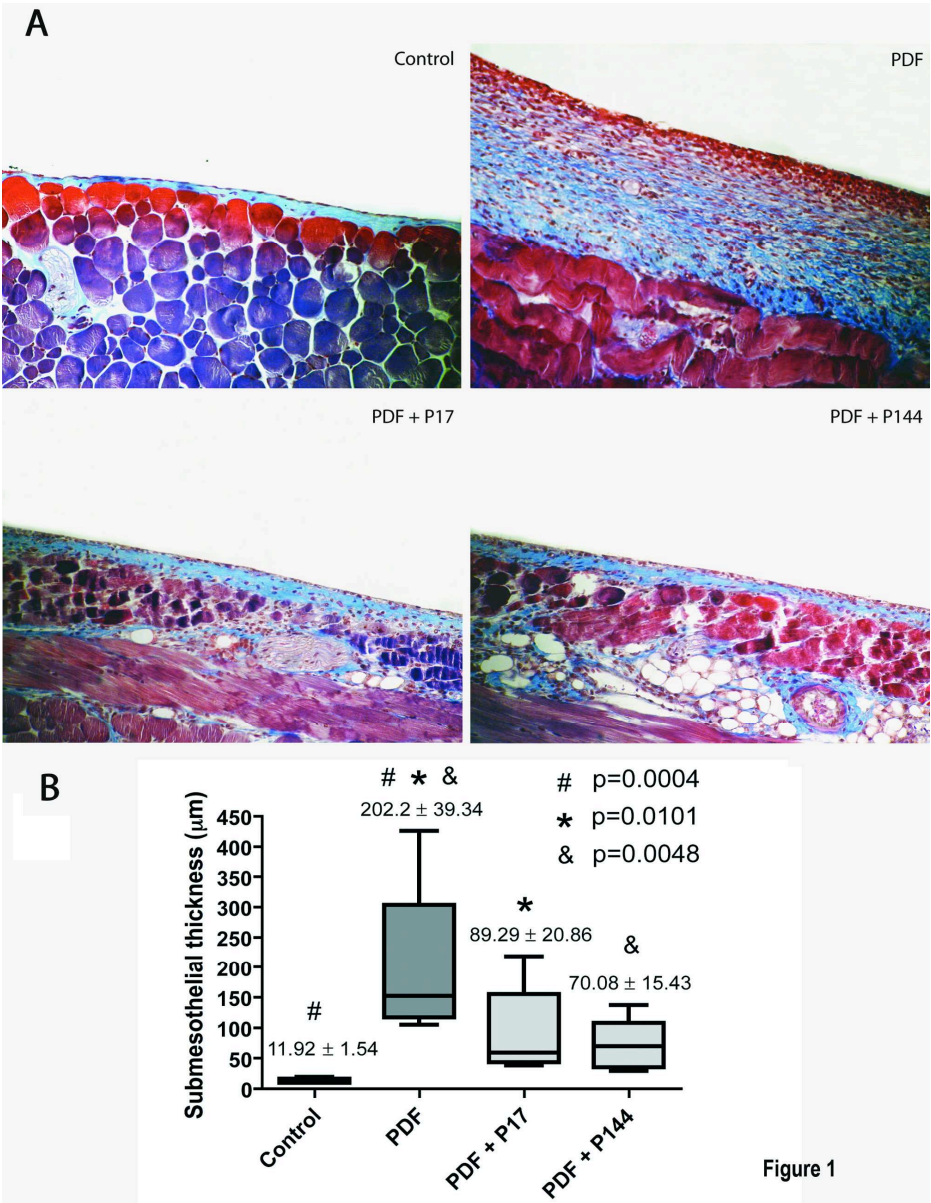


Figure 1. Administration of TGF-β1-blocking peptides P17 or P144 decreases PD-induced peritoneal membrane thickness in a mouse model. Mice received a daily instillation of standard PD fluid for 5 weeks and i.p. administrated with control peptide (4mg/kg/day: PDF, n=10), P17 (4mg/kg/day: PDF + P17, n=11), or P144 (4mg/kg/day: PDF + P144, n=11). A control group of mice that were instilled with saline was also included (Control; n=7). Peritoneal samples were prepared and analyzed as described in the Materials and Methods. (A) Standard PD fluid exposure increases matrix deposition and the thickness of the peritoneal membrane, while TGF-β1-blocking peptides administration significantly reduces these effects when measured in Masson's trichrome stained sections (representative slides). (B) Box Plots graphic represent 25th and 75th percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean ± SE. Symbols represent the statistic differences between groups. Magnification X200.
170x219mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

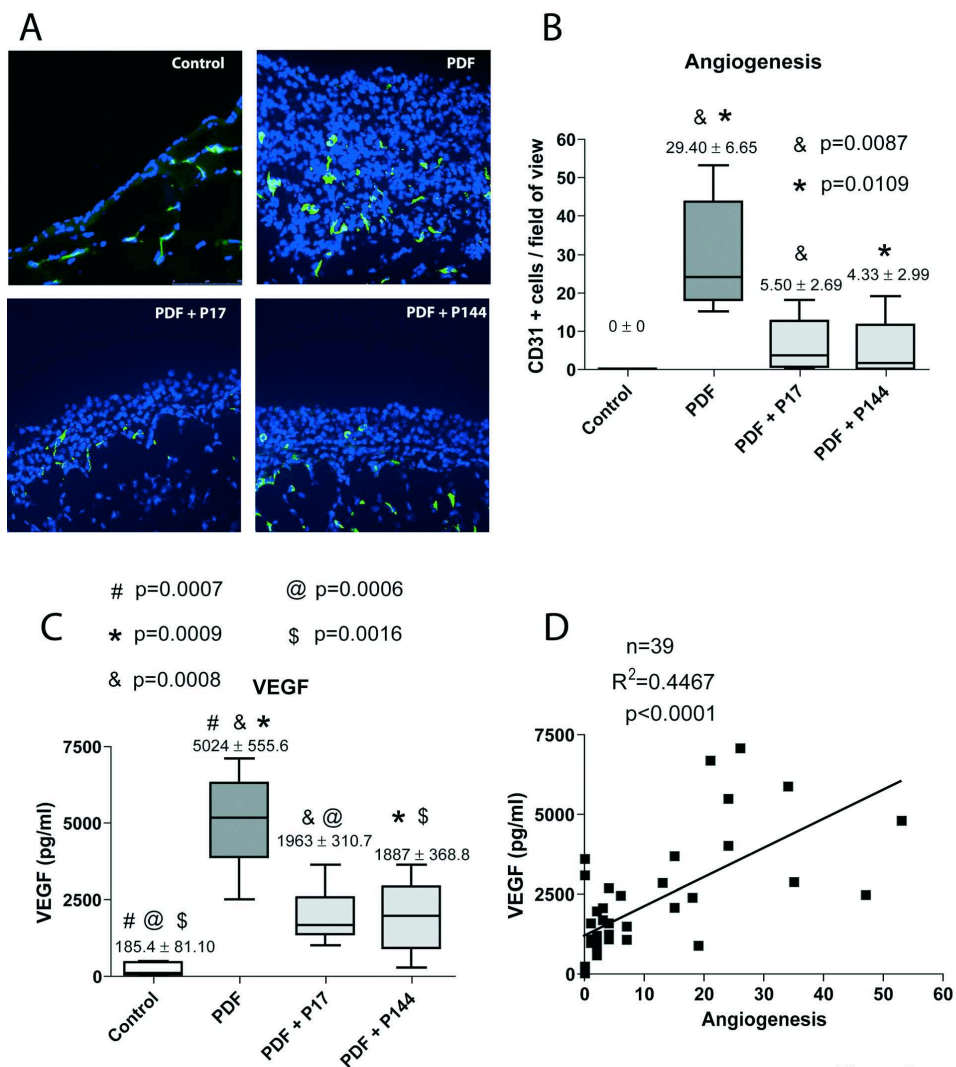


Figure 2. Treatments with TGF-β1-blocking peptides P17 or P144 decrease PD-induced angiogenesis and inhibit VEGF production. Mice received a daily instillation of standard PD fluid for 5 weeks and i.p. administrated with control peptide (PDF, n=10), P17 (PDF + P17, n=11), or P144 (PDF + P144, n=11). A control group of mice that were instilled with saline was also included (Control; n=7). (A) Standard PD fluid exposure increases peritoneal angiogenesis and TGF-β1-blocking peptides administration significantly reduces the number of vessels, as determined by CD31 staining (representative slides). (B) Box plots represent the median, minimum and maximum values, as well as the 25th and 75th percentiles. Numbers above boxes depict mean ± SE of CD31+ staining. Symbols represent the statistical differences between groups. Magnification x200. (C) Analysis of VEGF in the drained volumes shows a strong increase of this growth factor in PD fluid-instilled animals, and administration of TGF-β1-blocking peptides significantly reduces VEGF production. Box plots are depicted as picograms per millilitre and represent the median, minimum and maximum values, as well as the 25th and 75th percentiles. Numbers above boxes depict mean ± SE of VEGF levels. Symbols represent the statistical differences between groups. (D) Correlation between angiogenesis (CD31+ staining) and VEGF levels (pg/mL) in the whole group of mice (Spearman regression, p < 0.0001; n = 39).

170x187mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

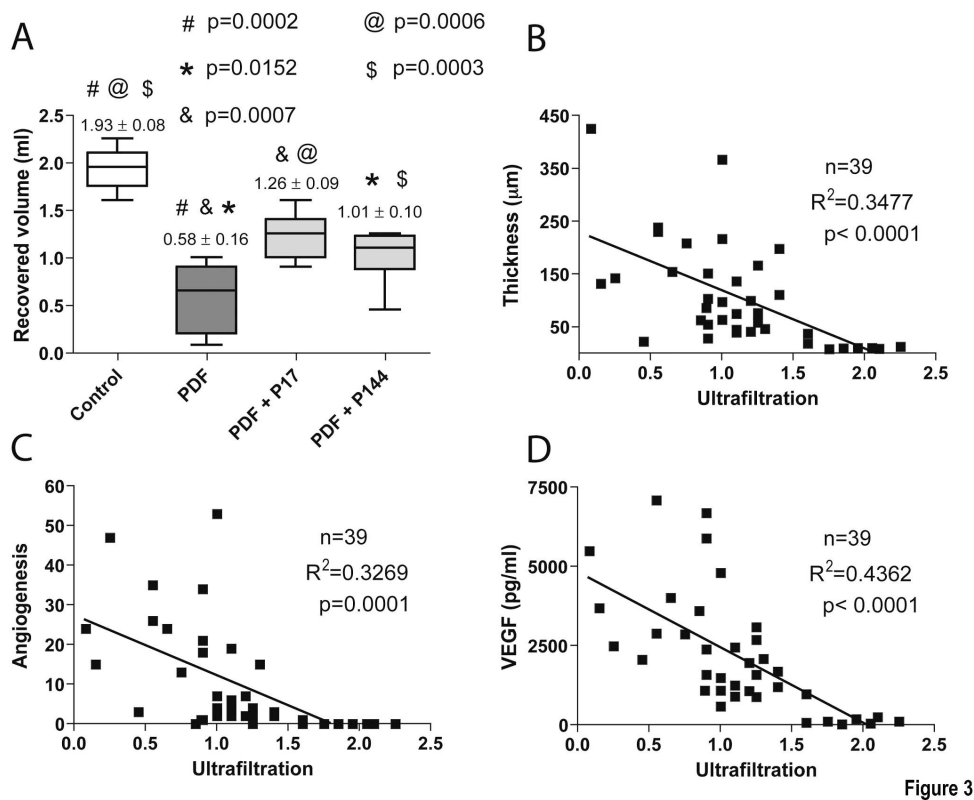


Figure 3.- TGF-β1-bocking peptides P17 or P144 treatments improve peritoneal ultrafiltration. A 30 minutes ultrafiltration test was performed on the last day of treatments. (A) The volumes recovered from animals exposed to PD fluid (PDF; n=10) are lower than those from mice instilled with saline solution (Control; n=7), and a increase of net ultrafiltration is obtained in mice exposed to PD fluid that were administrated P17 (PDF+P17; n=11) or P144 (PDF+P144; n=11). Box Plots graphic represent 25th and 75th percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols represent the statistic differences between groups. (B to D) Correlations between ultrafiltration and peritoneal thickness (μm), angiogenesis (CD31+ staining), and VEGF levels (pg/mL) in the whole group of mice (Spearman regression, $n = 39$)

180x146mm (600 x 600 DPI)

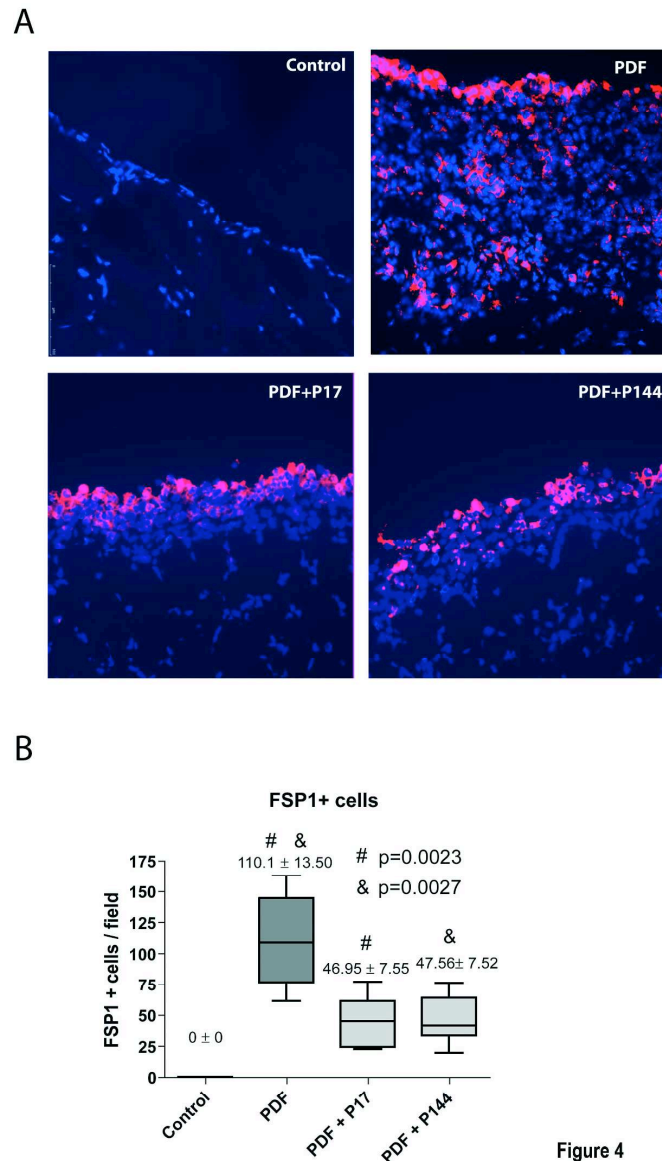


Figure 4. TGF- β 1-blocking peptides reduce the number of activated fibroblasts in the compact zone of parietal peritoneum. (A) Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal tissue sections stained for FSP-1 (red) with DAPI counterstaining shows accumulation of activated fibroblasts in the submesothelial space in the PDF group (n=10), and the administration of P17 or P144 peptides reduces the number of FSP-1 positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). The expression of FSP-1 is absent in animals instilled with saline (Control, n=7). Representative pictures are presented. Magnification X 200. (B) The reductions of the number of FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE.

Symbols show statistical differences between groups.
155x281mm (400 x 400 DPI)

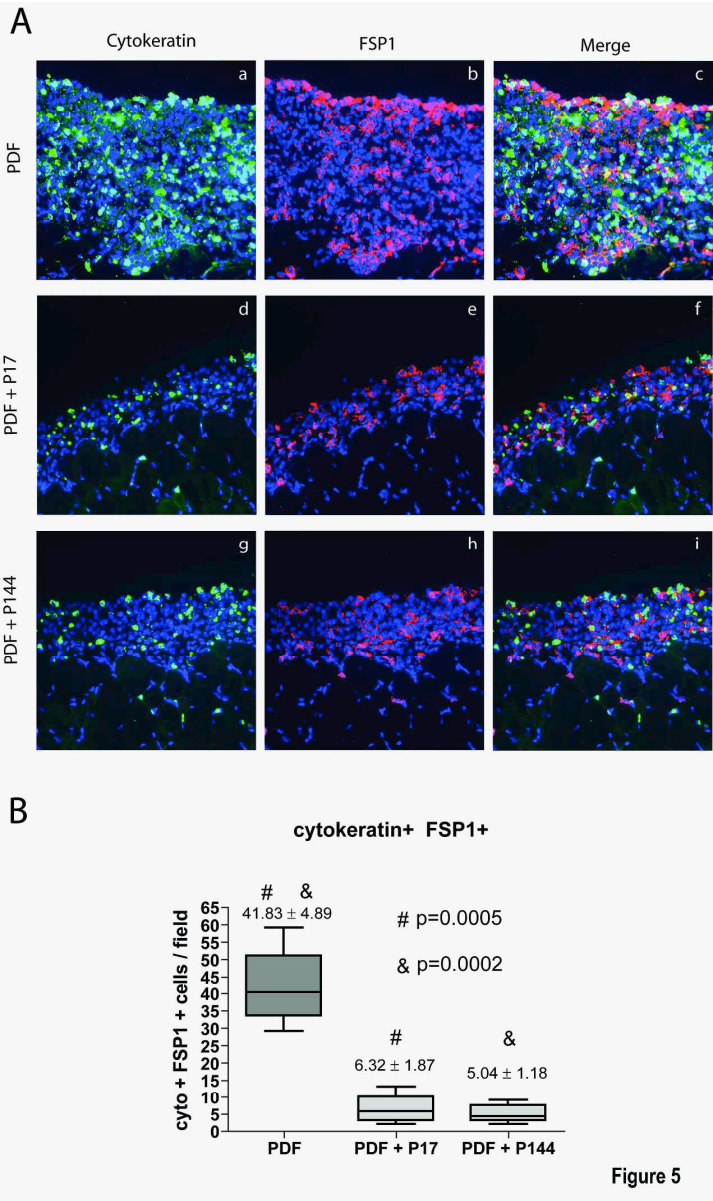


Figure 5. Effects of TGF-β1-blocking peptides on the number of activated fibroblasts derived from mesothelial cells. (A) Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal sections stained for cytokeratin (green) and FSP-1 (red) with DAPI counterstaining show accumulation of trans-differentiated mesothelial cells in the submesothelial space (cytokeratin positive cells) in the PDF group (n=10), some of which co-express FSP-1 (yellow cells in the Merge panel). The administration of P17 or P144 peptides reduces the number of cytokeratin/FSP-1 double positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Representative slides are presented Magnification X 200. (B) The reductions of the number of cytokeratin/FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean ± SE. Symbols show statistical differences between groups. 161x271mm (400 x 400 DPI)

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

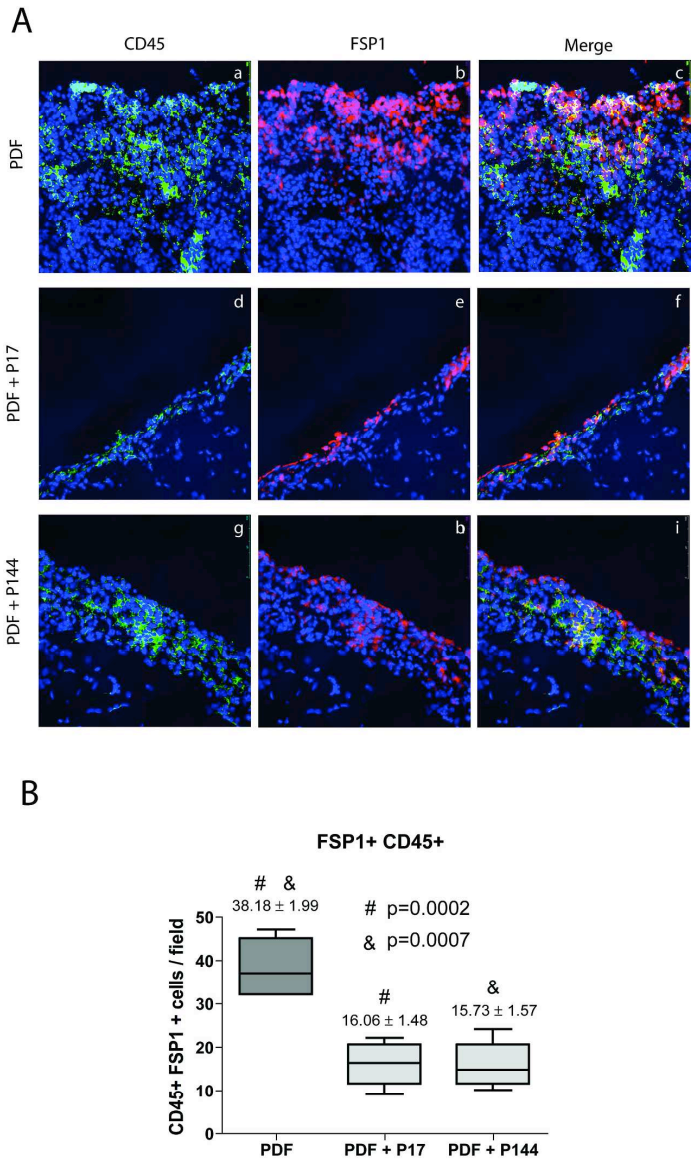


Figure 6

Figure 6. Effects of TGF-β1-blocking peptides on the number of activated fibroblasts derived from bone marrow-recruited cells. (A) Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal biopsies stained for CD45 (green) and FSP-1 (red) with DAPI counterstaining show the recruitment of circulating leukocytes in the PDF group (n=10), some of which co-express FSP-1 (yellow cells in the Merge panel). The administration of P17 or P144 peptides reduces the number of CD45/FSP-1 double positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Representative pictures are presented. Magnification X 200. (B) The reductions of the number of CD45/FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean ± SE. Symbols show statistical differences between groups.

161x280mm (400 x 400 DPI)

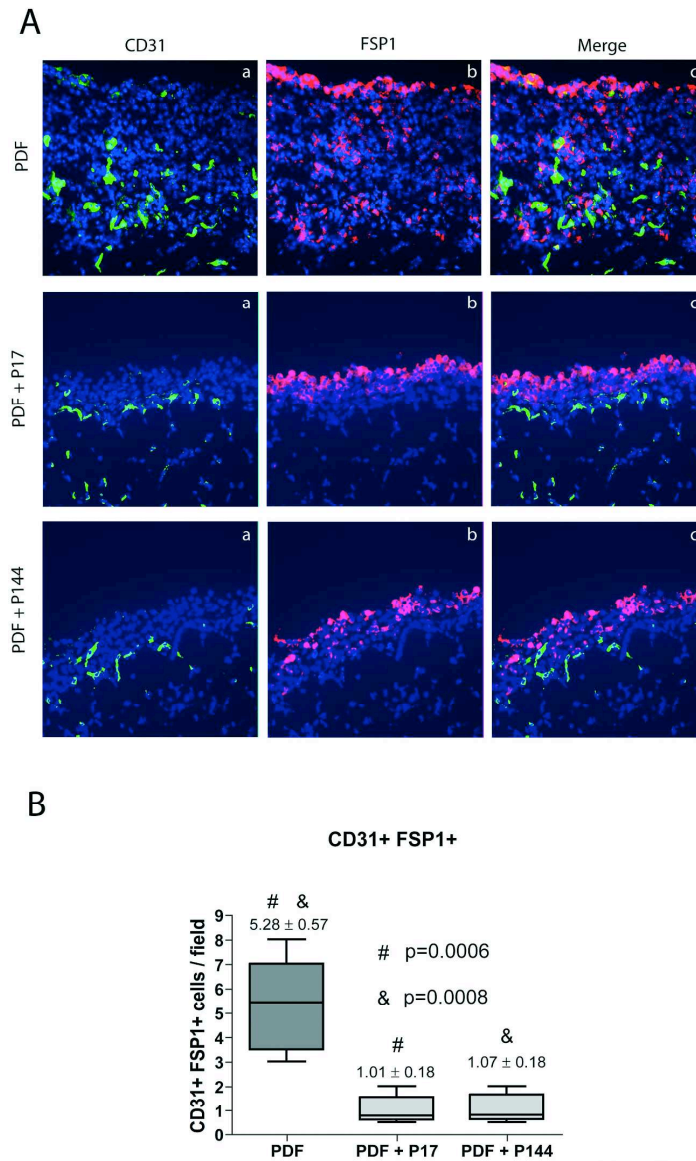


Figure 7

Figure 7. Effects of TGF- β 1-blocking peptides on the number of activated fibroblasts derived from endothelial cells. (A) Immunofluorescence microscopy analysis of parietal peritoneal samples stained for CD31 (green) and FSP-1 (red) with DAPI counterstaining show the appearance of CD31/FSP-1 double positive cells in the PDF group (n=10). The administration of P17 or P144 peptides reduces the number of CD31/FSP-1 double positive cells per field (PDF + P17, n=11; PDF + P144, n=11). Representative pictures are presented. Magnification X 200. (B) The reductions of the number of CD31/FSP-1 positive fibroblasts by P17 or P144 peptides are significant. Box Plots represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum values. Numbers above boxes depict mean \pm SE. Symbols show statistical differences between groups.

164x283mm (400 x 400 DPI)

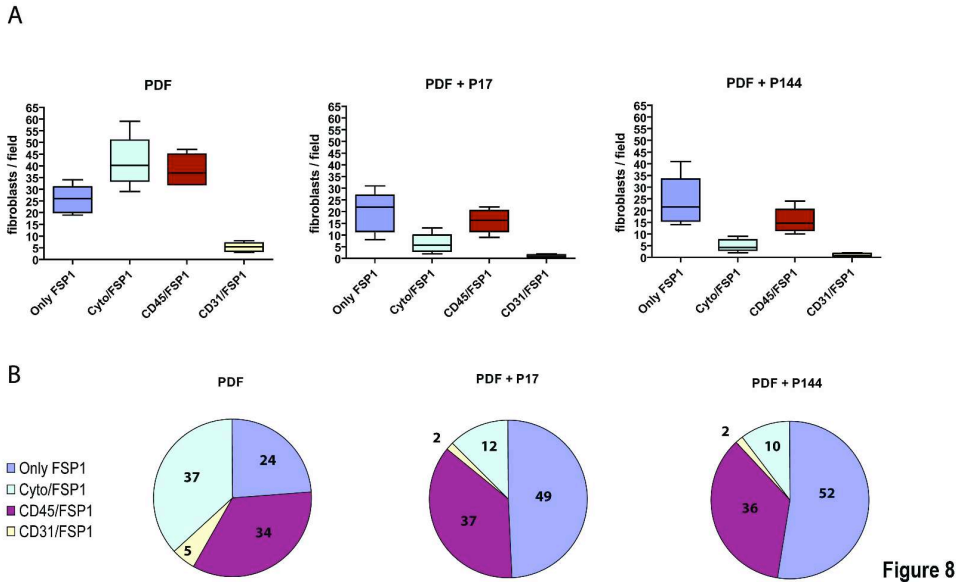


Figure 8. Relative effects of TGF- β 1-blocking peptides on the different subpopulations of activated fibroblasts. (A) Box Plot graphics represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum of the numbers of activated fibroblasts from different origin in the PDF, PDF + P17, and PDF + P144 groups. (B) Circles depict the average percentages of the different subpopulations of activated fibroblasts in the PDF, PDF + P17, and PDF + P144 groups.

170x101mm (500 x 500 DPI)

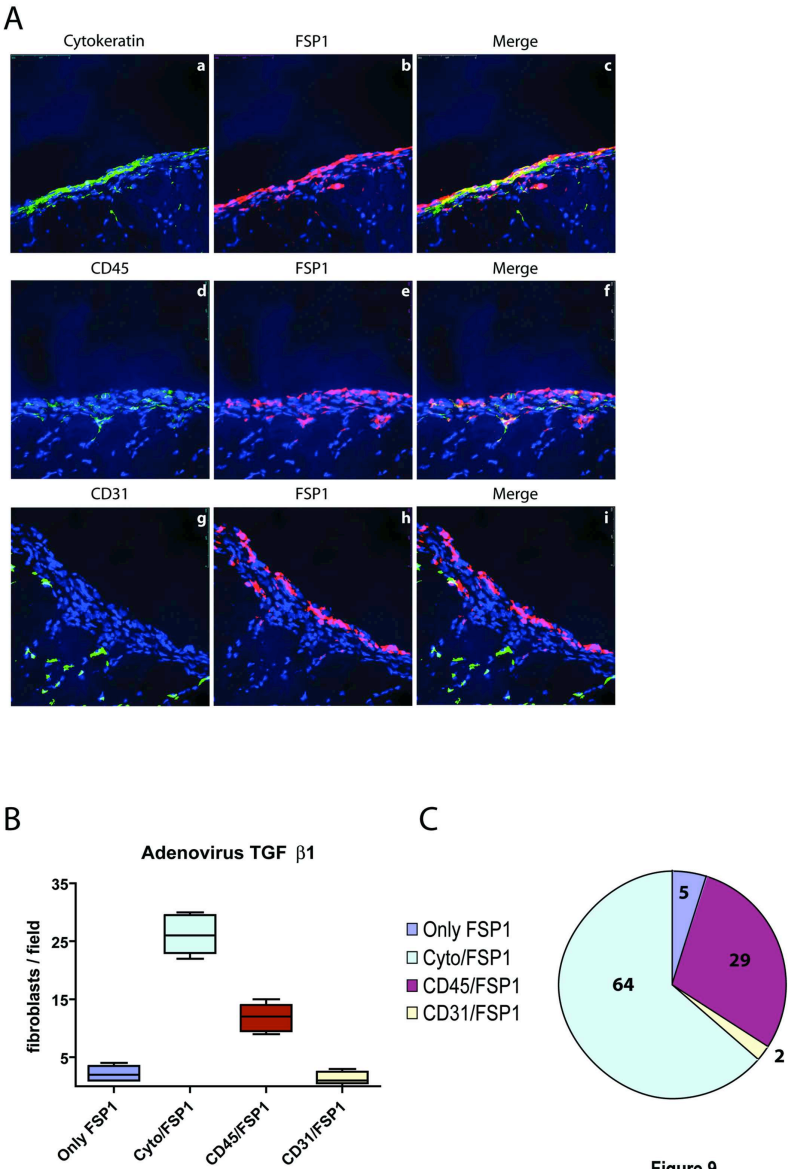
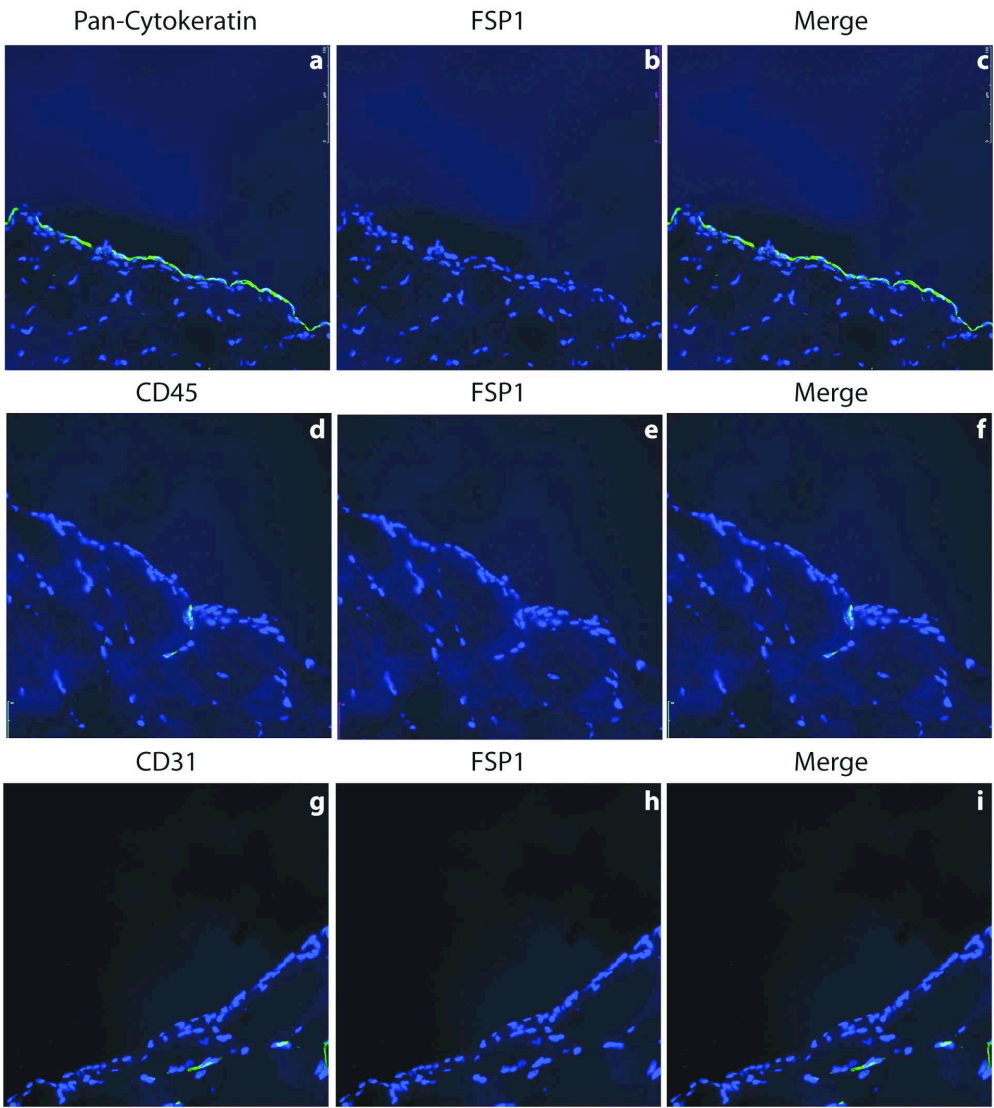


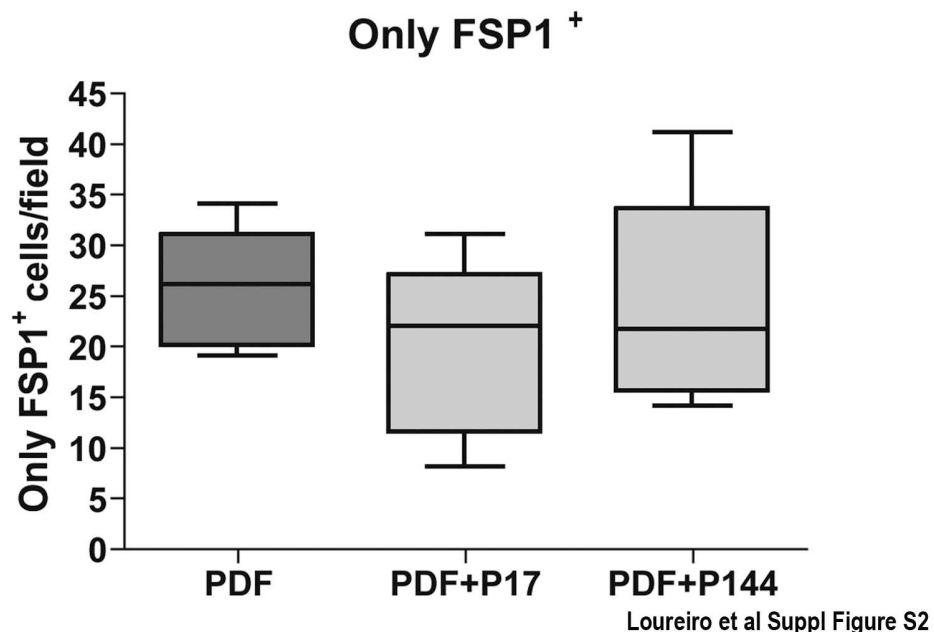
Figure 9. Over-expression of TGF- β 1 in the peritoneum induces the accumulation of activated fibroblasts, most of which deriving from mesothelial cells. Mice were infected with adenovirus encoding active TGF- β 1 by intraperitoneal injection, and animals were killed on day 4 after infection. (A) Parietal peritoneal sections were subjected to dual Immunofluorescence analysis using anti-FSP-1 antibody (red) in conjunction with antibodies against cytokeratin, CD45 or CD31 (green). A strong accumulation of cytokeratin/FSP-1 double positive fibroblasts is observed (yellow cells in the Merge panel). Representative slides are presented. Magnification X 200. (B) Box Plot graphics represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum of the numbers of activated fibroblasts from different subpopulations. (C) Circle depicts the average percentages of the different subpopulations of activated fibroblasts.

168x203mm (400 x 400 DPI)

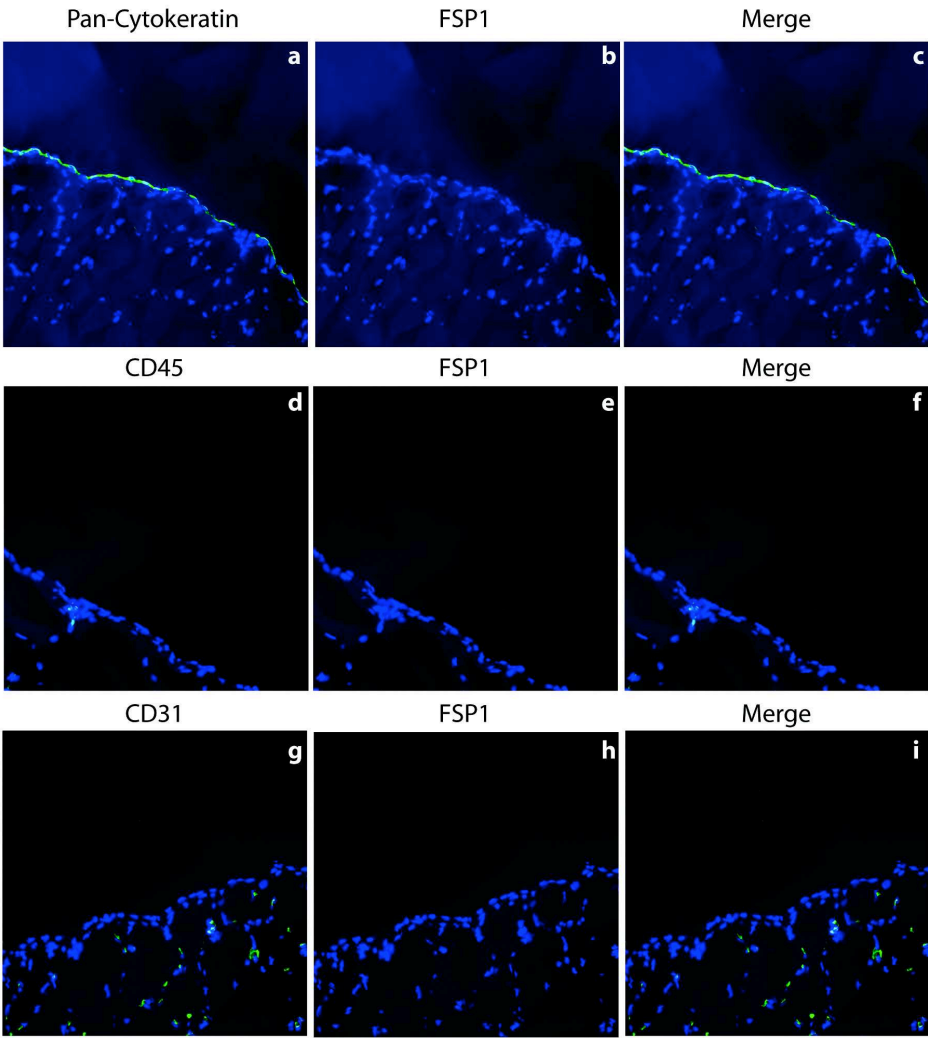


Loureiro et al Suppl Figure S1

Supplementary Figure S1. Dual immunofluorescence staining of peritoneal tissues from saline-instilled mice. In the peritoneum from control mice the expression of cytokeratin is restricted to the mesothelial cells monolayer and the expression of CD31 is confined to deeper vessels located in the muscular tissue. In these control mice there is no expression of FSP-1 and CD45+ cells are barely detected. Representative pictures are presented. Magnification X 200.
162x191mm (300 x 300 DPI)

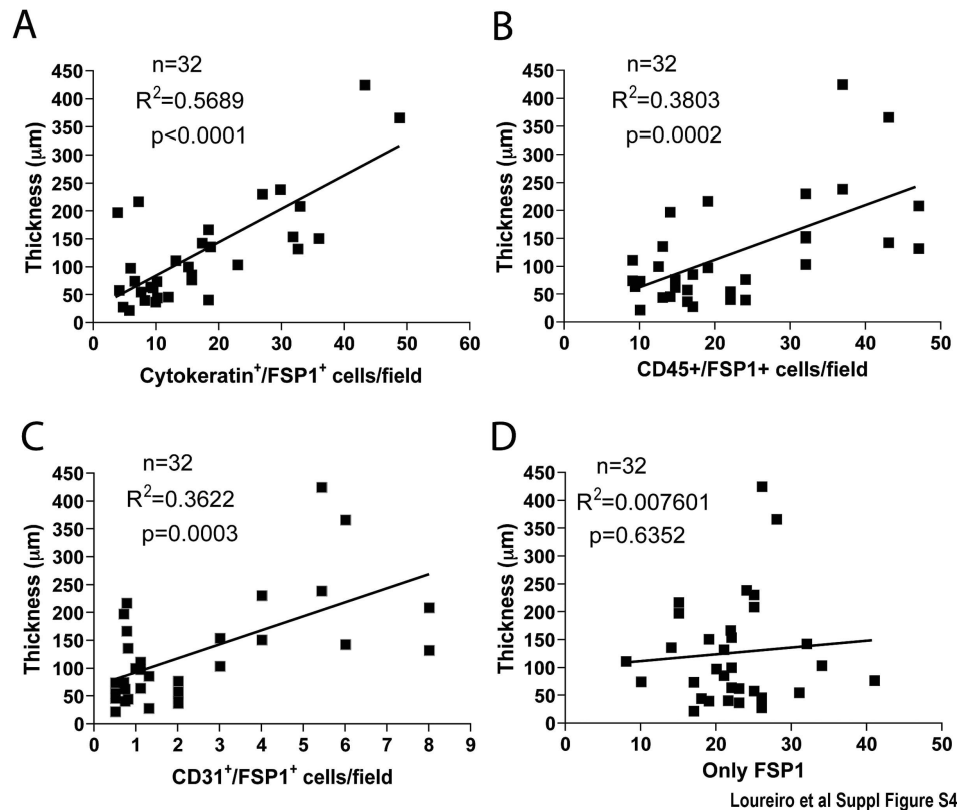


Supplementary Figure S2. TGF- β 1-blocking peptides do not affect the number of FSP-1 single positive fibroblasts. Box Plot graphics represent 25% and 75% percentiles, median, minimum and maximum of the numbers of FSP-1+ fibroblasts in the PDF, PDF + P17, and PDF + P144 groups
81x54mm (500 x 500 DPI)



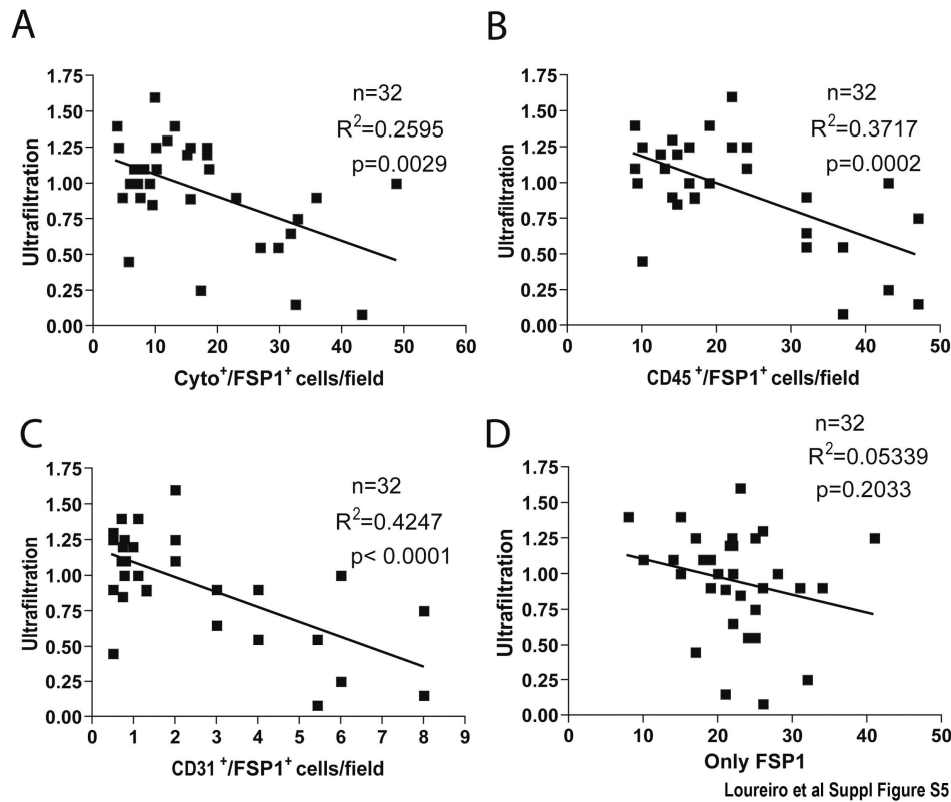
Loureiro et al Suppl Figure S3

Supplementary Figure S3. Dual immunofluorescence staining of peritoneal biopsies from mice infected with empty adenoviral vector. The peritoneal tissues from these control mice show expression of cytokeratin only in the mesothelial cells monolayer and the expression of CD31 is confined to deeper vessels. In these control mice there is no expression of FSP-1 and CD45+ cells are barely detected. Representative slides are presented. Magnification X 200. 163x180mm (300 x 300 DPI)

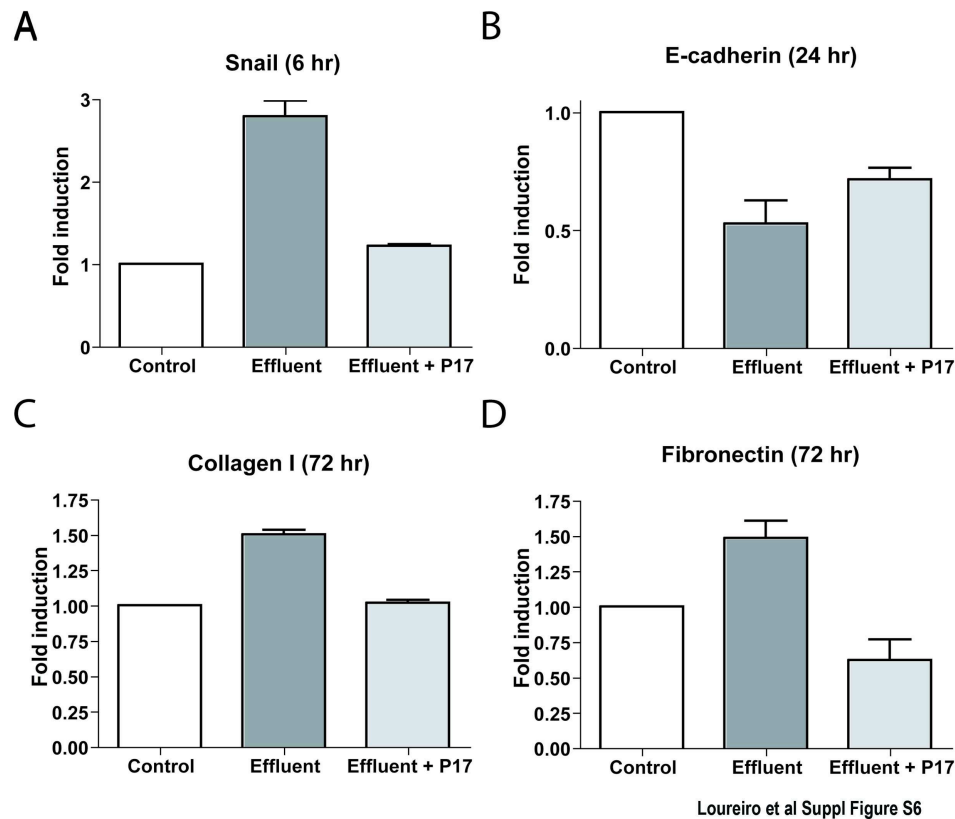


Supplementary Figure S4. Correlations between peritoneal fibrosis and different fibroblasts subpopulations. (A to C) In the whole group of mice instilled with PD fluid, the number of fibroblasts per field of the Cyto+/FSP-1+, CD45+/FSP-1+ and CD31+/FSP-1+ subpopulations correlate with peritoneal thickness (μm). Of note, the Cyto+/FSP-1+ subpopulation correlates with peritoneal fibrosis better than the other subpopulation. (D) Fibroblasts single positive for FSP-1 do not correlate with peritoneal fibrosis. (Spearman regression, $n = 32$).

162x131mm (400 x 400 DPI)



Supplementary Figure S5. Correlations between loss of ultrafiltration and different fibroblasts subpopulations. (A to C) In the whole group of mice instilled with PD fluid, the number of fibroblasts per field of the Cyto⁺/FSP-1⁺, CD45⁺/FSP-1⁺ and CD31⁺/FSP-1⁺ subpopulations correlate with the loss of ultrafiltration. Of note, the CD31⁺/FSP-1⁺ subpopulation correlates with peritoneal fibrosis better than the other subpopulation. (D) Fibroblasts single positive for FSP-1 do not correlate with loss of ultrafiltration. (Spearman regression, n = 32).
164x131mm (400 x 400 DPI)



Supplementary Figure S6. TGF- β 1-bocking peptide P17 interferes with effluent-induced MMT of mesothelial cells. Omentum-derived mesothelial cells were treated with PD effluents from patients with episodes of peritonitis for different time points. (A and B) Quantitative RT-PCR shows that peptide P17 blocks the induction of Snail and prevents E-cadherin down-regulation. (C and D) P17 blocks the up-regulation of the MMT-associated molecules collagen I and fibronectin. Bars depict mean \pm SE of three independent experiments